Über die

Einwirkung von Estern auf Hefen und andere :: Sproßpilze ::

Robert Heuß

Einwirkung von Estern auf Hefen und andere Sproßpilze.

Von der
KGL. TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZU MÜNCHEN
zur Erlangung der Würde eines
DOKTORS DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN
(Doktor-Ingenieurs)
genehmigte Dissertation.

ACAD.
LUDD.BAT.
BIBL.

Vorgelegt von
Diplom-Ingenieur Robert Heuß
aus **Stuttgart.**

Referent:
Professor Dr. Karl Lintner.

Korreferent:
Professor Dr. Andreas Lipp.

Tag der Annahme der Dissertation: 4. Dezember 1912.

Stuttgart.
Buchdruckerei Ludwig Bohland
1913.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Die vorliegende Arbeit entstand auf Veranlassung des Herrn Prof. Dr. H. Will und wurde in der physiologischen Abteilung der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München ausgeführt.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Will, für seine liebenswürdige Unterstützung während der Dauer der Arbeit meinen herzlichsten Dank zum Ausdruck zu bringen.

Inhalts-Verzeichnis.

Seite

I. Einleitung 1

II. Versuchsanstellung 13

III. Einwirkung von Essigsäureäthylester auf verschiedene Hefen und andere Sproßpilze in steriler, gehopfter Bierwürze.
1. Beobachtung der Einwirkung nach äußeren Erscheinungen 16
a) Tabellarische Uebersicht 26
2. Beobachtung der Einwirkung nach Zählungen 34
b) Tabellarische Uebersicht 34

IV. Essigsäureäthylester als Kohlenstoffquelle für verschiedene Hefen und andere Sproßpilze in rein mineralischer Nährlösung 40
Tabellarische Uebersicht 53

V. Einwirkung von Essigsäureamylester auf verschiedene Hefen und andere Sproßpilze in steriler, gehopfter Bierwürze.
1. Beobachtung der Einwirkung nach äußeren Erscheinungen 59
a) Tabellarische Uebersicht 64
2. Beobachtung der Einwirkung nach Zählungen 68
b) Tabellarische Uebersicht 70

VI. Essigsäureamylester als Kohlenstoffquelle für verschiedene Hefen und andere Sproßpilze in rein mineralischer Nährlösung 73
Tabellarische Uebersicht 82

VII. Assimilierung der Ester.
1. Aethylester 90
2. Amylester 93

VIII. Kurze Zusammenfassung der Hauptergebnisse der Untersuchungen 95

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546317_0034

I. Einleitung.

In jeder mit Organismen verschiedener Art infizierten Bierwürze, in jedem Naturmost (Trauben-, Obstmost), überhaupt in jeder für die Entwicklung von verschiedenartigen Mikroorganismen günstig zusammengesetzten Flüssigkeit, welche einer Infektion ausgesetzt war, wird, wie bekannt, meist ein sehr lebhafter Kampf zwischen den einzelnen Gruppen von Organismen um die Existenz und das Emporkommen geführt. Den Schilderungen von Will[1]) zufolge sind beispielsweise alle Erscheinungen, die zum Schluß in einer mit Bakterien und Sproßpilzen verschiedener Art durchsetzten Bierwürze beobachtet werden, das Endergebnis eines auf- und abwogenden Kampfes zwischen den anwesenden Organismen. Ein ähnlicher Kampf findet, wie Wortmann[2]) beschrieben, in den natürlichen Mosten statt.

Das Aufkommen eines Organismus und der schliessliche Sieg über den Mitbewerber hängt von verschiedenen Faktoren ab. Vor allem muß die Flüssigkeit eine für die Entwicklung der in Frage kommenden Organismen günstige Zusammensetzung besitzen. Dann sind die von der Zelle selbst gegebenen Bedingungen, ihr physiologischer Zustand und ihre Entwicklungsenergie, ferner äußere Bedingungen, wie Temperatur, Luftzufuhr oder -abschluss u. a. m. massgebend. Auf die einzelnen Momente des Kampfes und die mannigfachen Lebensäusserungen der Zellen, die sichtlich den Kampf unterstützen, oder ihn abschwächen, soll nicht eingegangen werden, es soll vielmehr nur diejenige Lebensäusserung hervorgehoben werden, die für das Bestehen des Kampfes eine ausschlaggebende Bedeutung besitzt, nämlich die direkte oder indirekte Erzeugung von Umsatzprodukten seitens der Mikroorganismen.

Schon lange ist durch Beobachtungen und durch Versuche bekannt, daß nicht nur die verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen (Fadenpilze, Sproßpilze, Bakterien) gegen

[1]) Will, H., Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1909. 32. S. 674.
[2]) Wortmann, J., Weinbau und Weinhandel 1902. S. 521. Vergl. Koch's Jahresbericht 1902. 13.

Alkohol und Säuren in verschiedenem Grade empfindlich sind, sondern auch, dass innerhalb der Gruppen Schwankungen und Verschiedenheiten in bezug auf Empfindlichkeit bestehen. Dabei zeigen sich die verschiedenen Funktionen der Zelle, die vegetative und die physiologische, in verschiedener Weise beeinflusst.

Auf die ziemlich umfangreiche Literatur, die in dieser Frage vorliegt, soll nicht näher eingegangen werden. Es seien hier nur einige Aeußerungen von M. Hayduck[3]), der sich wohl als einer der ersten eingehender mit den vorliegenden Fragen, soweit sie die Spiritusfabrikation betreffen, beschäftigte, angeführt. Er spricht sich einmal folgendermassen aus: „Die Gärtätigkeit der Hefe ist das beste Schutzmittel gegen die Vermehrung der Spaltpilze. Es ist daher eine reichliche Hefenaussaat anzuwenden, damit die Gärung möglichst bald nach dem Anstellen beginnt. Ein Zusatz von 0,1 % H_2SO_4 wirkt ebenfalls schützend, wobei zu bemerken ist, daß die Säure gegen bereits vorhandene Spaltpilze nichts auszurichten vermag.“ In einer andern Arbeit: „Ueber den Einfluss einiger Säuren auf die Entwicklung und Gärtätigkeit der Hefe“ bemerkt der gleiche Verfasser, daß die Gegenwart größerer oder geringerer Mengen von Säuren auf die Hefe einen zweifachen Einfluß ausüben kann. Die Tätigkeit der Hefe besteht bekanntlich wesentlich aus zwei Funktionen: in der Zersetzung von Zucker zu Alkohol und Kohlensäure und in der Bildung neuer Zellen. Hayduck sucht nun zu entscheiden, ob der Säuregehalt in der Gärungsflüssigkeit beide Funktionen der Hefe in gleicher Weise beeinflußt, derart, daß bei wachsendem Säuregehalt Gärwirkung und Wachstum der Hefe gleichmäßig geschädigt bezw. aufgehoben werden, während bei geringerem Säuregehalt vielleicht beide Funktionen in gleichem Maße gefördert werden, oder ob Gärwirkung und Wachstum durch die Gegenwart verschiedener Säuremengen in verschiedener Weise beeinflußt werden. Unter den geprüften Säuren befanden sich auch Mineralsäuren, welche zwar nicht als Umsetzungsprodukte der Mikroorganismen in Frage kommen, aber bei den Versuchen die verschiedene Empfindlichkeit der Hefe gegen verschiedene Säuren sehr gut erkennen ließen. Die Mineralsäuren wirken anscheinend viel ungünstiger, als organische Säuren, wie Milch-, Ameisen-, Essig- oder Buttersäure u. a. m., denen bei den natürlichen Gärungen eine grosse praktische Bedeutung zukommt. Allgemein schließt Hayduck aus seinen Versuchen:

[3]) Hayduck, M. Zeitschr. f. Spiritusindustrie 1880. 3. S. 202.

1. Alle betrachteten Säuren, sowie die von Märcker untersuchten flüchtigen Fettsäuren schädigen die Tätigkeit der Hefe, wenn der Säuregehalt der Gärungsflüssigkeit einen gewissen Grad überschreitet. Dabei wirken die verschiedenen Säuren in sehr ungleichem Maße gärungshemmend.
2. Der schädigende Einfluss der Säuren äußert sich auf die Gärwirkung und das Wachstum der Hefe nicht in gleicher Stärke. So wird das Wachstum der Hefe schon durch einen geringeren Säuregehalt geschädigt, als die Gärwirkung der Hefe.
3. Sehr geringe Säuremengen können auf die Gärung und die Hefenentwicklung fördernden Einfluß haben.

Hayduck[4]) beschäftigt sich auch mit dem Einfluß des Alkohols auf die Entwicklung der Hefe. Nach seiner Ansicht ist der während des Gärungsprozesses gebildete Alkohol von grösstem Einfluss auf den Verlauf der Gärung. Wie alle gärungshemmenden Stoffe wirkt auch der Alkohol schon in geringen Mengen nachteiliger auf die Hefenbildung, als auf die Gärwirkung der Hefe. Die Gärung wird unterdrückt, wenn 15 Vol% Alkohol in der Versuchsflüssigkeit enthalten sind, während geringere Mengen eine bedeutende Verlangsamung der Gärung verursachen. 5% Alkohol verhinderten unter den gegebenen Verhältnissen die Hefenentwicklung, bei Aussaat von frischer Hefe lag die Grenze erst bei 8,7 Vol% Alkohol.

Ganz ähnliche Untersuchungen wie Hayduck hat Th. Bokorny[5]) ausgeführt. Er stellte unter anderem fest, dass die Buttersäure kein ungewöhnlich starkes Gift sei; 0,05% davon reichten nicht aus, um die Vermehrung der Hefe in einer Nähr- und Gärlösung zu unterdrücken. Salzsäure verhinderte die Vermehrung der Hefe schon bei 0,1%, manchmal sogar schon bei 0,05%. Die Grenze der Einwirkung der Isovaleriansäure auf Hefe wurde zwischen 0,05 und 0,1% gefunden. Normale Kapronsäure wirkt bei 0,1% noch vermehrungshemmend auf Hefe ein, bei 0,05% nicht mehr. Eine 0,1%-ige Lösung von Isokapronsäure ist nicht imstande, die Hefenentwicklung zu verhindern.

Oben wurde schon darauf hingewiesen, daß nicht nur die einzelnen Formenkreise der Mikroorganismen sich gegen diesen Einfluss von Alkohol und Säuren verschieden verhalten, sondern daß auch innerhalb dieser Formenkreise selbst wieder einzelne Gruppen sich befinden, die sich durch ihre morpho-

---

[4]) Hayduck, M. a. a. O. 1882. 5. S. 183.
[5]) Bokorny, Th., Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1907. 18. S. 171.

logischen Eigentümlichkeiten und ihr übriges physiologisches Verhalten enger aneinander schliessen, durch ihre verschiedene Empfindlichkeit gegen Alkohol und Säuren abgrenzen.

In dieser Hinsicht sei — abgesehen von den Beobachtungen Wortmann's — auf die durch Will veranlaßten Untersuchungen von H. Leberle[6]), J. Dachs[7]), J. Scheckenbach[8]) und O. Schimon[9]), sowie auf die Versuche von Geiger[10]) hingewiesen. Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß beispielsweise die Mykodermen, wie sie von Will abgegrenzt wurden, grössere Mengen von Alkohol und organischen Säuren vertragen, als die Torulaceen und dass von diesen wieder die zweite Untergruppe widerstandsfähiger ist, als die erste.

Säuren und Alkohol als Umsatzprodukte werden bei der Betrachtung des Verhaltens verschiedener Organismen, wenn sie gleichzeitig in der nämlichen Nährflüssigkeit enthalten sind, als „Kampfmittel" bezeichnet. Diese Bezeichnung hat jedenfalls insofern ihre volle Berechtigung, als Säuren und Alkohol, wie ausgeführt, unter bestimmten Bedingungen und in bestimmten Mengen die vegetativen, wie die physiologischen Funktionen der Zelle zu hemmen, ja schliesslich ihren Tod herbeizuführen vermögen. Die letale Dosis der organischen Säuren und des Gärungsalkohols liegt, wenigstens für die Sproßpilze im allgemeinen, verhältnismäßig hoch. Sollen nun Säuren und Alkohol ihre volle Wirkung als Kampfmittel ausüben, so müssen sie in rasch ansteigender Menge erzeugt werden, da sie in geringen Mengen nur hemmend wirken. Diese hemmende Wirkung geht jedoch auch nur bis zu einer gewissen Grenze, um sich dann in das Gegenteil zu kehren und sowohl die vegetativen, wie auch die physiologischen Funktionen der Zelle anzuregen und zu steigern. Alkohol und Säure wirken dann als Reizstoffe oder Nährstoffe. Unterhalb dieses Verdünnungsgrades tritt dann wieder ein Gleichgewichtszustand ein, die Umsatzprodukte verhalten sich indifferent.

Betrachtet man die Wirkungsweise der Umsatzprodukte auf einen einzelnen Organismus für sich, so erscheint diese

---

[6]) Leberle, H. Dissertation München 1909. Vergl. auch Will & Leberle, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1910. 28. S. 1.

[7]) Dachs, J. Dissertation München 1908. Vergl. auch Will & Dachs, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1908. 21. S. 386.

[8]) Scheckenbach, J. Dissertation Erlangen 1911. Vergl. auch Will & Scheckenbach, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1912. 34. S. 1.

[9]) Schimon, O. Dissertation München 1911. Vergl. auch Will u. Schimon, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1912. 35. S. 81.

[10]) Geiger, A. Dissertation München 1910. Derselbe, Zentralblatt Bakt. II. Abt. 1910. 27. S. 97.

nicht weiter auffällig, sie schließt sich den allgemeinen Erfahrungen an, wie sie beispielsweise von H. Schulz[11]) für Hefengifte gemacht wurden. Zieht man dagegen die Wechselwirkung der verschiedenen in einer Nährlösung enthaltenen Mikroorganismen in Betracht, so müsste man eigentlich von einem als Kampfmittel bezeichneten Umsetzungsprodukt voraussetzen, daß es schon in kleinsten Mengen, wenigstens auf gewisse Gruppen der Mikroorganismen, hemmend wirkt. Wenn also beispielsweise in einer Nährflüssigkeit Bakterien und Hefen gleichzeitig vorhanden sind, von denen erstere hauptsächlich Säure als Umsatzprodukt hervorbringen, um sich damit ihrer Gegner zu erwehren, so müßten schon sehr geringe Mengen von Säure giftig auf Hefezellen wirken, wenn sie als Kampfmittel dienen sollen. Jedenfalls dürften sie nicht die vegetativen und physiologischen Lebensäußerungen des Gegners anregen, wie es bei der Einwirkung einer Säure auf Hefen geschieht, denn damit würde ja die entgegengesetzte Wirkung ausgelöst werden. Wenn gleichwohl, entgegen den durch Versuche am Einzelorganismus festgestellten Tatsachen, eine schädigende Wirkung durch sehr geringe Mengen der Umsatzstoffe anscheinend stattfindet, so müssen die Verhältnisse wohl komplizierter sein, als man bisher angenommen hat, und bedürfen noch der Klarlegung. Bei der Beurteilung der auf diesem Gebiet gemachten Untersuchungen ist aber wohl zu beachten, daß die bei den Versuchen als entwicklungshemmend gefundene Dosis von Säuren und Alkohol nicht ohne weiteres auch für die natürliche Gärung angenommen werden darf. Beim künstlichen Hinzufügen eines Umsatzproduktes stehen die Zellen auf einmal der Einwirkung desselben gegenüber, bei der natürlichen Gärung dagegen hat der Organismus Zeit und Gelegenheit, sich der allmählichen Entstehung der Umsatzprodukte anzupassen. Bei direktem Zusatz gewisser Mengen von Umsatzstoffen kann für kurze Zeit eine Hemmung der Zellfunktionen eintreten, bis sich der Organismus angepaßt hat, dann aber tritt unter Umständen eine Steigerung seiner Tätigkeit ein, die soweit gehen kann, daß die Umsatzstoffe assimiliert werden, wie dies für Säuren und Alkohol bekannt ist. Interessante Ausführungen darüber finden sich in den bereits erwähnten Arbeiten von Leberle[12]), Dachs[13])

[11]) Schulz, H. Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie. II. 40

[12]) Leberle, H. Dissertation München 1909. Vergl. auch Will u. Leberle, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1910. 28. S. 1.

[13]) Dachs, J. Dissertation München 1908. Vergl. auch Will u. Dachs, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1908. 21. S. 386.

und Scheckenbach[14]), sowie bei Lindner[15]). Ferner bei F. Ehrlich[16]), J. Takahashi[17]), K. Saito[18]), sowie bei H. Zikes[19]).

Diese Assimilierung tritt nach den vorliegenden Beobachtungen selbst dann ein, wenn die Nährlösung an sich schon günstig für die Entwicklung der Organismen zusammengesetzt ist. Unter diesen Umständen darf wohl angenommen werden, daß die Organismen ihre eigenen Umsatzprodukte, soweit sie noch assimilierbar sind, selbst wieder assimilieren. Wenn man sich erst einmal in die komplizierten Vorgänge, die sich bei der Konkurrenz von Mikroorganismen in der gleichen Nährflüssigkeit abspielen, hineingedacht hat, so wird man sich darüber klar, dass mancher der jetzt als Kampfmittel bezeichneten Umsatzstoffe diesen Namen nicht verdient. Alkohol dürfte, da die Gärung bei den meisten Hefen rasch einsetzt und rasch zu größeren Mengen ansteigt, wohl seinen Platz bei den Kampfmitteln behaupten. Anders wird es wohl bei verschiedenen organischen Säuren sein, die eine geringe Giftwirkung aufweisen, von denen es daher grosser Mengen bedarf, um die vegetativen, und noch größerer, um die physiologischen Funktionen zu hemmen, und die auch von konkurrierenden Organismen leicht assimiliert werden.

Gewisse Gruppen von Säuren werden wohl aus der Reihe der Kampfmittel auszuscheiden haben. Jedenfalls ist der Begriff „Kampfmittel", der so oft zur Erklärung biologischer Erscheinungen gebraucht wird, in Beziehung auf den Kampf der Mikroorganismen untereinander ein relativer und zunächst nur für die letale und entwicklungshemmende Dosis feststehender.

Zu den bei der natürlichen alkoholischen Gärung entstehenden Stoffen gehören nun auch — neben Alkoholen und Säuren — die „Ester".

Wie die Ester entstehen, ist zweifelhaft. Sie können entweder außerhalb der Zelle durch Zusammentreten der als Gärungsprodukte auftretenden Säuren und Alkohole entstehen, oder aber sie sind auf eine synthetische Tätigkeit der Hefe im Innern der Zelle zurückzuführen wie es z. B. Kayser und

---

[14]) Scheckenbach, J. Dissertation Erlangen 1911. Vergl. auch Will u. Scheckenbach, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1912. 34. S. 1.

[15]) Lindner, P. Wochenschr. f. Brauerei 1912. 29. S. 1.

[16]) Ehrlich, F. Biochemische Zeitschrift 36. S. 477.

[17]) Takahashi, J. Journ. Tokyo chem. Society 1910. 31. Vergleiche Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1911. 29. S. 280.

[18]) Saito, K. Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1911. 29. S. 289.

[19]) Zikes, H., Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1910. 26. S. 91.

Demolon[20]) annehmen und worauf auch der mehrfach beobachtete „Fruchtäthergeruch“ der Hefe bei der Selbstgärung hinzudeuten scheint. Die bei der natürlichen Gärung in Frage kommenden Ester sind angenehm fruchtähnlich riechende Flüssigkeiten. An dem charakteristischen Geruch werden sie auch in den geringsten Mengen sofort erkannt. An dem Bukett (der Blume) gegorener Flüssigkeiten sind sie wohl in erster Linie beteiligt, infolgedessen haben sie immer wieder die Aufmerksamkeit erregt und es finden sich deshalb auch in der Literatur zahlreiche Angaben über das Auftreten von „Fruchtäthergeruch“. Bei der Bedeutung, welche den Estern für die Endprodukte der alkoholischen Gärung zukommt, ist es verständlich, dass auch Versuche zu ihrer qualitativen und quantitativen Bestimmung gemacht wurden. Von den zahlreichen Angaben über Esterbildung überhaupt, seien nur einige angeführt, die sich hauptsächlich mit dem Vorkommen von Aethyl- und Amylacetat beschäftigen.

Ward[21]) weist darauf hin, daß Bakterium aceti in Gemeinschaft mit einer als Verunreinigung der Ingwerbierhefekörner vorkommenden kleinen, weissen Oberhefe grosse Mengen von Essigäther bildet.

Lafar[22]) beschreibt einen Sproßpilz, der kräftig Essigsäure bildet und teilt bei den entsprechenden Versuchen über den Geruch der Flüssigkeit folgendes mit: „Schon 23 Stunden nach Versuchsbeginn war ein feiner, esterartiger Geruch zu konstatieren, der in der Folge stärker wurde. Das Maximum der Intensität desselben fiel zeitlich annähernd mit jenem der Säureproduktion zusammen, von da an trat wieder eine Abnahme ein und am 33. Versuchstag war er bereits ganz verschwunden.“

Beyerink[23]) erwähnt eine sporenbildende Essigätherhefe. Bald erkannte man, dass es gewisse Arten von Sproßpilzen gebe, die in besonders hervorragendem Maße die Fähigkeit aufwiesen, Ester zu bilden.

Steuber[24]) weist darauf hin, dass die Gattung „Anomalus“ in Zuckerlösungen reichlich Essigäther bildet.

---

[20]) Kayser et Demolon. „Contribution à l'étude des produits volatils dans la fermentation alcoolique.“ Deuxième mémoire. Sonderabdruck.

[21]) Ward, M. The Brewer's Guardian 1891. Vergl. Koch's Jahresber. 1891. 2.

[22]) Lafar, F. Zentralbl. Bakt. 1893. 13. S. 694.

[23]) Beyerink. Zentralbl. Bakt. 1894. 16. S. 49.

[24]) Steuber, L. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1900. 23. S. 3.

Henneberg[25]) beschreibt zwei „Kahmhefen", die bei der Gärung Essigester bilden.

Ausser dem bisher erwähnten Essigsäureäthylester, kurz Essigester, Essigäther oder auch Aethylacetat genannt, wurde auch Amylacetat, also eine Verbindung der Essigsäure mit Amylalkohol, beobachtet, wie aus einer Arbeit von Barker[26]) hervorgeht.

Schander[27]) zufolge macht sich während und nach der Gärung mit dem sogen. Sacch. apiculatus ein starker Geruch nach Essig- und Amylester in unangenehm auffallender Weise bemerkbar.

Röhling[28]) weist bei seinen mit Apiculatusformen angestellten Untersuchungen ebenfalls häufig auf auftretenden „Fruchtäthergeruch" hin.

Dass auch Ester der höheren Alkohole bei den Gärungsprodukten zu finden sind, erwähnt Czapek[29]).

Went & Prinsen Geerligs[30]) beschreiben eine Hefe, in deren Gärungsprodukten sie 0,113% Aethylacetat nachwiesen, während Chapmann[31]) bei der Untersuchung von sechs englischen Bieren 0,021—0,052% Ester, als Aethylacetat berechnet, fand.

Viel Interessantes über die Ester enthalten die Veröffentlichungen der französischen Forscher Kayser und Demolon[32]), die besonders eine esterbildende Ananashefe erwähnen. Wie bereits angeführt, entstehen nach ihrer Ansicht die Ester im Innern der Zelle; der Lüftung bei der Gärung schreiben sie einen weitgehenden Einfluss auf die Esterbildung zu. Durch anwesende Hefe sollen die entstandenen Ester zum Teil wieder zerstört werden, teilweise werden sie auch durch die bei der Gärung entstehende Kohlensäure mitgerissen.

---

[25]) Henneberg, W. Wochenschr. f. Brauerei 1903. 20. S. 137.
[26]) Barker, P., Ann. of Botany 1900. Vergl. Koch's Jahresbericht 1900. 11.
[27]) Schander, R. Bericht d. kgl. Lehranstalt Geisenheim a. Rh. 1903.
[28]) Röhling, A. Dissertation Erlangen, 1905.
[29]) Czapek. „Biochemie der Pflanzen". Fischer-Jena 1905. Bd. I, S. 253.
[30]) Went & Prinsen Geerligs. Koch's Jahresber. 1894. 5.
[31]) Chapmann, C. Journ. of the fed. Institute of Brewing 3. Vergl. Koch's Jahresber. 1897. 8.
[32]) Kayser et Demolon. „Sur la vie de la levure après fermentation". „Sur la formation, la variation et l'évolution des éthers dans les liquides fermentés". „Influence de l'aëration sur la formation des produits volatils dans la fermentation alcoolique". Revue de viticulture 1909. Sonderabdrucke.

Henneberg[33]) erwähnt, daß die „Mykoderma variabilis“ in alkoholhaltigen Flüssigkeiten, sowie bei der Gärung reichlich Essigäther bildet.

A. Bau[34]) äussert sich in Lafar's Handbuch der Technischen Mykologie Bd. 4. S. 394 ff. folgendermassen: „Die bei der Gärung entstehenden Geruchstoffe sind die bereits erwähnten Ester der Alkohole und Fettsäuren, die sämtlich flüchtiger Natur sind. Ausser diesen flüchtigen Bukettstoffen, zu denen sich noch der neutrale Bernsteinsäureäthylester gesellt, kommen im Wein, voraussichtlich auch im Bier, nichtflüchtige Ester vor, die nach K. Windisch sehr wesentlich zum Geschmack des Weines beitragen. Es sind dies der saure Bernsteinsäureäthylester und die während der Gärung entstehenden Ester der Weinsäure und der Apfelsäure, welch letztere beiden Säuren in den Trauben vorgebildet sind.“

Lindner[35]) berichtet von dem Weinbukettschimmel „Sachsia suaveolens“, daß dieser Pilz besonders charakterisiert sei durch das herrliche Bukett, das er in Würze oder Würzegelatinekulturen entwickelt. Derselbe Verfasser erwähnt Fruchtätherbildung in Grünmalz durch Hefen, die nach dem Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung als dem Sacch. anomalus nahestehend bezeichnet werden müssen. In seiner „Mikroskopischen Betriebskontrolle“ findet sich auch eine diesbezügliche Abbildung „Fruchtätherhefe auf Grünmalz“[36]). Nach neueren Beobachtungen ist es in diesem Fall nicht ausgeschlossen, daß diese Esterentstehung auf intramolekulare Atmung zurückzuführen ist.

Das Auftreten von Estern bei der natürlichen Gärung und die anscheinend damit verbundenen Erscheinungen haben nun zu verschiedenen Vermutungen über ihre Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen geführt. Wie Alkohol und Säuren wurden auch sie als „Kampfmittel“ bezeichnet.

Lindner[37]) schreibt ihnen eine stark antiseptische Wirkung gegen Bakterien zu: „Durch die Ausbildung des Fruchtäthers, der wochenlang in unverminderter Stärke in den meisten Glasröhren (mit der Fruchtätherhefe) wahrzunehmen ist, wird ohne allen Zweifel die voraufgegangene Bakterienvegetation zu Grunde gerichtet, da die zusammengesetzten Ester stark

---

[33]) Henneberg, W., „Gärungsbiologisches Praktikum“. Parey-Berlin. 1909. S. 434.

[34]) Lafar, F. „Technische Mykologie“. Fischer-Jena 1904—1907.

[35]) Lindner, P. „Mikroskopische Betriebskontrolle“ 5. Aufl. 1909. Parey-Berlin S. 365.

[36]) Lindner, P. Ebenda S. 148.

[37]) Lindner, P. Wochenschr. f. Brauerei 1896. 13. S. 552.

antiseptische Eigenschaften, namentlich gegen viele Bakterien, entwickeln. Die Fruchtäther sind offenbar ein von manchen Hefen, wenn ich mich so ausdrücken darf, absichtlich ausgewähltes Schutzmittel im Kampf gegen ihre Feinde. Auch die Kulturhefen erzeugen solche."

Ferner gibt Lindner[38]) an: „Auffällig ist, wie wenig solche Würzen, die Fruchtätherhefe enthalten, selbst in unbedeckten Gefässen durch andere Organismen verunreinigt werden, sie bleiben nahezu bakterienfrei, offenbar infolge der antiseptischen Wirkung der Fruchtäther."

Lindner stützt seine Anschauungen über die antiseptischen Eigenschaften der Ester nur auf gelegentliche Beobachtungen, nicht auf systematische Versuche. Nach unsern Erfahrungen treffen diese Anschauungen in der Allgemeinheit nicht zu. Bei verschiedenen unserer Versuche, die — wie bei der Versuchsanstellung ausführlich beschrieben werden wird — immer Ester in verschiedenen Mengen enthielten, traten ab und zu unfreiwillige Infektionen mit Schimmel sowohl, als auch mit Stäbchenbakterien auf. Wir haben einige Fälle beobachtet, in welchen in einer mit 1 % Essigester versetzten Bierwürze, in der die Weinhefe „Schloss Johannisberg" eingeimpft war, eine aus Stäbchenbakterien bestehende Infektion in keiner Weise durch die zugegebene Estermenge beeinträchtigt wurde. Dieser, sowie einige andere Fälle, bei denen eine Infektion mit Bakterien oder Schimmel bei gleich hohem Estergehalt in Kulturen mit Torula 3, Steinberg 1892 und Mykoderma decolorans ebenfalls nicht zurückgehalten wurde, während doch die den Kolben zugesetzte Estermenge weit größer war, als sie je bei natürlichen Gärungen gebildet wird, sprechen nicht dafür, daß den Estern allein eine antiseptische Wirkung gegen Bakterien, wenigstens den hier in Frage kommenden, zugeschrieben werden kann.

Lindner[39]) ist ferner geneigt, die seit langem bekannte, stark hemmende Wirkung des Apiculatus gegenüber andern Hefenarten auf Esterbildung durch den Sacch. apiculatus zurückzuführen: „In jüngster Zeit habe ich bei der Züchtung grösserer Mengen von Dextrosehefen, wie z. B. Sacch. apiculatus und der Dextrosehefe 129 unserer Sammlung, ebenfalls die Erfahrung gemacht, daß diese namentlich bei reichlicher Durchlüftung und bei Gegenwart genügend großer Dextrosemengen in der Würze eine intensive Fruchtätherbildung aufweisen. Wenn man diese Hefen einfach in Bierwürze gären

[38]) Lindner, P. Mikroskop. Betriebskontrolle S. 467.
[39]) Lindner, P. Wochenschr. f. Brauerei 1896. 13. S. 552.

lässt, ohne Lüftung, merkt man davon so gut wie gar nichts. Immerhin wird die von Hansen ermittelte Tatsache, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sacch. apiculatus in einer Würze, in der die stark vergärende Rasse Carlsberg I ausgesät war, letztere erheblich geschwächt wurde, einigermassen verständlich. Da die Apiculatushefe in Betrieben, die noch Kühlschiffe haben, häufig recht zahlreich anzutreffen ist, haben diese Beobachtungen auch einige praktische Bedeutung. Besonders wird dies aber für die Weingärung gelten, denn hier in dem dextrosereichen Most ist die Apiculatushefe ein ständiger Gast, und man nimmt dem Wein vielleicht etwas von seinem eigenartigen Bukett, wenn man dem Most von vornherein gleich soviel Reinhefe zuführt, daß der Apiculatus gar nicht erst zur Erzeugung von Fruchtäthern gelangt."

Wäre Lindner's Anschauung von der hemmenden Wirkung der durch Sacch. apiculatus gebildeten Ester — unter denen wahrscheinlich hauptsächlich der Essigsäureäthylester in Frage kommt — richtig, dann müsste man annehmen, daß entweder sehr geringe Mengen des erzeugten Esters entwicklungshemmend auf andere Hefen einwirken, oder aber, daß die Esterbildung bei der natürlichen Gärung durch den Apiculatus rasch in so hohem Maß zunimmt, dass die erzeugte Menge diejenige Grenze weit überschreitet, innerhalb welcher noch eine Vermehrung, beispielsweise von Weinhefen, stattfindet und der Ester selbst durch die Hefen assimiliert wird. Voraussetzung ist bei dieser Annahme, daß der Apiculatus selbst gegen Ester unempfindlich oder weit weniger empfindlich ist, als andere Hefen und Sprosspilze.

Delbrück hat bezüglich der bei Gärungen gebildeten Ester im wesentlichen die gleiche Anschauung, auch er faßt sie als Schutz- und Kampfmittel auf. Er hat seine Auffassung in sein System der natürlichen Reinzucht eingereiht, während Lindner's Auffassung außerhalb dieses Systems ausgesprochen war. Delbrück[40]) äussert sich folgendermassen: „Merkwürdig ist, dass in der Natur frei lebende Hefen, die Wein- und Fruchthefen, speziell estererzeugende sind. Man könnte annehmen, dass die Kulturhefen in gewissem Sinn abgeschwächte Organismen sind, sie finden schon einen Schutz in der für sie von dem Züchter passend hergestellten Züchtungsmedium, anders die „wilden" Hefen. Sie sind auf sich allein im Kampf ums Dasein angewiesen. Vielleicht bilden die Ester ein besonders kräftiges Kampfmittel".

[40]) Delbrück u. Schönfeld. „System der natürlichen Reinzucht." Parey-Berlin 1903. S. 140.

Die Ester werden also von verschiedener Seite als Schutz- und Kampfmittel der Mikroorganismen bei dem Wettbewerb mit andern betrachtet. Ueber ihre Wirkung liegen bisher jedoch nur wenige und zwar nur gelegentliche Beobachtungen vor. Systematische Untersuchungen, die wenigstens einigermassen eine Grundlage für die Beurteilung geben, wenn auch nicht die restlose Lösung der Frage bringen würden, liegen bis jetzt nicht vor. Deshalb veranlasste mich Herr Professor Will, der Frage nahezutreten, nachdem er schon vor Jahren einige diesbezügliche Vorversuche ausgeführt hatte, die jedoch bisher nicht veröffentlicht wurden.

Die Fragestellung war zunächst folgende:

1. Wirken die Ester auf die vegetative Funktion der Hefen und anderer Sproßpilze?

a) Welche Mengen der Ester hemmen bei Zusatz zu einer für die Vermehrung der Versuchsorganismen günstig zusammengesetzten Nährlösung deren Entwicklung?

b) Bei welchen Mengen werden die Versuchsorganismen unter sonst gleichen Bedingungen abgetötet?

Im Verlauf dieser Untersuchungen ergaben sich Anzeichen dafür, dass die Ester unter Umständen eine fördernde Wirkung auf das Wachstum der Organismen ausüben, diese Beobachtung führte zu den weiteren Fragen:

2. Assimilieren die Versuchsorganismen die Ester?

3. Welche Vorgänge spielen sich dabei ab?

II. Versuchsanstellung.

Bei den vorliegenden Untersuchungen kamen insgesamt folgende 23 Organismen zur Verwendung:

Stamm 7 Will, Stamm 93 Will } Zeitschr. ges. Brauwesen 1895. 18.

Oberhefe 25 Regensburger, Oberhefe 170 Regensburger } Zentralbl. Bakt. II Abt. 1906. 16. S. 289.

Steinberg 1892, Schloss Johannisberg } Hefen der kgl. Lehr- und Versuchsanstalt zu Geisenheim a. Rh.

Wilde Hefe 811 Will. Zeitschr. ges. Brauwesen 1891. 14.

Saccharomyces pastorianus Hansen.

Saccharomyces ellipsoideus Hansen.

Willia anomala Hansen.

Willia anomala Var. II. Steuber. Zeitschr. ges. Brauwesen 1900. 23.

Pichia membranaefaciens Hansen.

Mykoderma decolorans Will. Zentralbl. Bakt. II. Abteilung 1910. 28. S. 30.

Mykoderma valida Leberle. Zentralbl. Bakt. II. Abteilung 1910. 28. S. 1.

Torula 2 Will, Torula 3 Will, Torula 15 Will } Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1906. 17.

Torula 12. Ein hautbildender Sprosspilz, der sich unter der vorläufigen Bezeichn. „Torula 12“ in der Sammlung der Station befindet.

Apiculatus Form 1, Apiculatus Form 3, Apiculatus Form 4, Apiculatus Form 7 } Aus der Sammlung der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München.

Sachsia suaveolens. Weinbukettschimmel. Lindner. Mikr. Betriebskontrolle. Parey-Berlin 1909. 5. Aufl. S. 365.

Bei den einzelnen Versuchen wurden die jeweils geeignet erscheinenden Organismen herausgegriffen; dabei achtete man nach Möglichkeit darauf, daß die verschiedenen Gruppen vertreten waren.

Alter der Kulturen:

Zur Verwendung kamen immer nur frische, kräftige Kulturen, die vor der Impfung mikroskopisch auf ihre Beschaffenheit und Reinheit untersucht worden waren. Ihr Alter schwankte je nach Art und Vermehrungsvermögen zwischen zwei und vier Tagen; es ist bei den einzelnen Versuchen stets angegeben.

Nährlösungen:

Als Nährlösung wurde bei der einen Reihe von Versuchen eine 11, 5%-ige, sterile, gehopfte Bierwürze benützt, bei der andern Reihe eine schwach sauer reagierende Lösung von

1% $(NH_4)_2SO_4$; 0,8% KH_2PO_4
0,3% $MgSO_4$ u. 0,05% KCl

in destilliertem Wasser.

Verwendete Ester:

Essigsäureäthylester (Siedepunkt 77°) und Essigsäureamylester (Isoamylester, Siedepunkt 137°).

Esterzusatz:

Die beiden Ester wurden den Nährlösungen in solchen Mengen zugesetzt, daß sich folgende Konzentrationen ergaben: 0,01. 0,03. 0,06. 0,125. 0,25. 0,5. 0,75. 1. 2. 3. 4 und 5%. Die Löslichkeitsgrenze des Essigesters in Würze liegt, wie durch Versuche festgestellt wurde, zwischen 4 und 5%. Bei Zusatz von mehr Ester entsteht in der Würze eine Emulsion. Daher schien es nicht nötig, Versuche mit noch grösseren Estermengen anzusetzen. Der verwendete Amylester löst sich in Würze so gut wie gar nicht, beim Schütteln bildet er eine Emulsion, nach längerem Stehen sammelt er sich auf der Würzeoberfläche wieder an. Um jedoch die Gleichartigkeit der Versuche zu wahren, wurde auch in diesem Falle bis zu 5% Ester zugesetzt. Die genaue Herstellung der Konzentrationen geschah wie folgt: Erst wurde die für jeden Versuch berechnete Gesamtmenge von Würze bezw. mineralischer Lösung in große Pasteurkolben gefüllt und sterilisiert. Ich stellte mir immer 3 Lösungen her: Reine Würze ohne Esterzusatz, Würze mit 5% und Würze mit 1% Ester. Die verschiedenen Zwischenstufen erhielt ich durch Verdünnen der beiden angegebenen Konzentrationen mit reiner Würze nach einfacher Berechnung.

Abfüllvorrichtung:

Nach Vorgang von J. Scheckenbach[11]) füllte ich meine Lösungen folgendermaßen ab: Auf einem neben dem

[11]) Scheckenbach, J. Dissertation Erlangen 1911. Vergl. auch Will u. Scheckenbach. Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1912. 34. S. 1.

Arbeitstisch stehenden Schrank wurde ein grosser Pasteurkolben in geneigter Lage aufgestellt. Er war mittels eines Schlauches, an dem sich ein Quetschhahn befand, mit einer Ueberlaufbürette mit automatischer Nullpunkteinstellung verbunden. Von dieser Bürette war ein Schlauch durch ein in der oberen Ecke des auf dem Tisch stehenden Impfkastens befindliches Loch in jenen geführt. Am Ende des Schlauchs befand sich ein spitz ausgezogenes Glasrohr und oberhalb desselben ein Quetschhahn. Sämtliche Teile des Apparates waren sterilisiert worden. Die beiden Oeffnungen des oberen Kugelansatzes der Bürette waren mit einem Gummi- bezw. Wattepfropfen versehen.

Impfung:

Jeder Versuchskolben erhielt eine Platinöse voll als Einsaat und zwar je nach Art des Organismus Absatz oder Haut.

Durchführung der Versuche:

Sämtliche Versuche wurden in kleinen, sterilen Erlenmeyerkölbchen, die mit Wattebausch verschlossen waren, angesetzt. Jeder Kolben enthielt 50 ccm Flüssigkeit. Stets wurden Doppelversuche durchgeführt. Zum Vergleich diente jedesmal ein sogen. blinder Versuch (B. V.), der also den Organismen nur die normale Nährlösung ohne Esterzusatz bot. Die Beobachtungen, die sich äußerlich auf auftretende Trübung, Gärung, Absatz- oder Hautbildung erstreckten, wurden, wenn nötig, täglich, sonst in grösseren Zwischenräumen gemacht und die Ergebnisse in Tabellen eingetragen. Die Kulturen standen stets bei Zimmertemperatur (18—22°.) Sie wurden zu Anfang und am Ende jedes Versuchs mikroskopisch untersucht.

Bei sämtlichen Arbeiten wurden die Regeln der Asepsis beobachtet. Die Kolben wurden immer vor dem Oeffnen mit 70 %-igem Alkohol gewaschen und sodann abflambiert. Die zum Abfüllen verwendeten Schläuche lagen ca. 12 Stunden in einer Sublimatlösung 1 : 1000, vor Gebrauch wurden sie mit sterilem Wasser behandelt.

Zählungen:

Die Zählungen wurden in üblicher Weise mit der Thoma'schen Zählkammer durchgeführt. Die in den Tabellen zusammengestellten Zahlen sind zuverlässige Mittelwerte aus mehreren Versuchen.

Zur Impfung der Kulturen diente ein Kolben mit 200 ccm steriler, gehopfter Bierwürze, der einen Zusatz von 2—3 ccm des in frisch herangezüchteten Kulturen vorhandenen Absatzes der Versuchsorganismen erhielt. Nach kräftigem Schütteln wurde die in der Zähleinheit vorhandene Anzahl von Zellen

bestimmt. Bei der später durchgeführten Zählung, bei der jeder Versuchskolben von dieser „Impflösung“ genau 1 ccm zugefügt erhielt und die den Zweck hatte, den Einfluss des Esters in verschiedenen Konzentrationen auf die Vermehrung der Organismen festzustellen, wurde ebenfalls immer die durchschnittliche Anzahl von Zellen in der Zähleinheit berechnet, so dass man durch den Vergleich der Zahlen untereinander stets ein übersichtliches Bild der Vorgänge in den Versuchskolben erhielt.

Die Zählung begann immer kurz vor Eintritt der Gärung und schloß am Ende derselben ab. Um dabei einerseits das Zusammenballen der Zellen zu vermeiden und andrerseits die Uebersichtlichkeit der Zählkammer zu wahren, wurden die zur Zählung kommenden Proben nach Angabe von Hansen nach Bedarf mit Schwefelsäure (1 : 10) verdünnt und tüchtig geschüttelt.

Die zu den Versuchen gehörigen Tabellen befinden sich in allen Kapiteln jeweils am Schluss des beschreibenden Textes. Sie sind in gekürzter Form gegeben und enthalten nur die für das Verständnis der Versuche nötigen Angaben.

III. Einwirkung von Essigsäureäthylester auf verschiedene Hefen und andere Sproßpilze in steriler, gehopfter Bierwürze.

1. Beobachtung der Einwirkung nach äußeren Erscheinungen.

Die Versuchsanstellung war folgende: Kleine mit Wattebausch verschlossene, sterile Erlenmeyerkolben erhielten je 50 ccm sterile Würze. Der Ester wurde dieser in folgenden Abstufungen zugesetzt: 0,01. 0,03. 0,06. 0,125. 0,25. 0,5. 0,75. 1. 2. 3. 4 und 5 %. Zum Vergleich diente ein sogen. blinder Versuch mit je 50 ccm Würze ohne Esterzusatz.

Die Untersuchungen erstreckten sich in diesem Fall auf folgende 17 Organismen:

Stamm 7	Mykoderma decolorans
Stamm 93	Willia anomala Hansen
Oberhefe 25	Torula 2
Oberhefe 170	Torula 3
Wilde Hefe 811	Apiculatus Form 1
Sacch. pastorianus	Apiculatus Form 2
Sacch. ellipsoideus	Apiculatus Form 4
Steinberg 1892	Apiculatus Form 7
Schloss Johannisberg	

Grundlage für die hier aufgeführten Beobachtungen und Erläuterungen sind die während der Versuche geführten und am Schluss des Abschnittes in gekürzter Form gebrachten Tabellen, welche über die durch die Versuchsorganismen hervorgerufenen äußeren Erscheinungen (Trübung, Gärung, Absatzbildung, Hautbildung u. a. m.) genaue Aufzeichnungen enthalten und wiederholte Versuchsreihen zusammenfassen. Die Beobachtungszeit betrug 16 Tage. Die Kulturen waren kräftig und stets 2 Tage alt.

Stamm 7:

In den niederen Konzentrationen 0,01—0,75% begann und endigte die Gärung zur gleichen Zeit, wie beim B. V. Die Hefe ging noch bei Zusatz von 3% Ester — wenn auch stark verspätet — an, bei 4% Esterzusatz trat nur ab und zu noch Vermehrung ein. Es schienen also in diesem Falle besonders günstige Bedingungen und Zufälligkeiten vorliegen zu müssen, wenn den Zellen noch ein Wachstum ermöglicht werden sollte. 5% Ester wirkten ohne weiteres tötlich, was schon mit Hilfe des Mikroskops einwandfrei festzustellen war. Der Sicherheit halber wurden aber nach 16tägigem Stehen die Bodensätze der 5% Ester enthaltenden Kolben mit frischer steriler Würze beschickt: ein Wachstum machte sich nicht mehr bemerkbar.

Bei den höheren Konzentrationen, d. h. von 1% an aufwärts, traten folgende charakteristische Erscheinungen auf: Der Zeitpunkt des Beginns und des Endes der Gärung bezw. Vermehrung wurde immer weiter hinausgerückt, „verzögert", je mehr Ester die Kolben enthielten. War aber die Gärung erst einmal eingetreten, so ging sie in normaler Weise, meist sogar rascher als gewönlich, vor sich. Die schliesslich entstandenen Absätze erreichten — rein äusserlich betrachtet — fast in allen Kolben die gleiche Stärke, wie der zugehörige B. V., bei manchen Konzentrationen — besonders in den niederen —

übertrafen sie ihn sogar. Der Aethylester wurde also von Stamm 7 in den niederen Konzentrationen aufgenommen, ohne einen, oder wenigstens keinen äusserlich ins Auge fallenden, schädlichen Einfluss auf Vermehrung und Gärung auszuüben. In den höheren Konzentrationen, die bedeutende Mengen von Ester enthielten, war die Sache anders. Es schien dort zuerst ein Anpassungs- (Accomodations)-prozess vor sich zu gehen, durch welchen die Vermehrung und damit der äußerlich sichtbare Beginn der Gärung verzögert wurde. Die Gärung verlief meist in der bei den niederen Konzentrationen und auch beim B. V. beobachteten Zeit, ab und zu etwas rascher. Es bestand also bei den höheren Konzentrationen zweifellos anfänglich eine Verzögerung, dann aber vielfach eine geringe Beschleunigung der Vermehrung und Gärung.

Wie eine am Schluß dieses Abschnittes beigefügte kleine Tabelle zeigt, ging die Hefe noch bei einem Zusatz von 3% Ester mit starker Absatzbildung an. Die zeitliche Differenz zwischen dem Gärungsende der niederen und dem der höchsten unter diesen Versuchsbedingungen angegangenen Konzentration, betrug nur 3 Tage. Man kann also die untergärige Bierhefe Stamm 7 als ziemlich anpassungs- und widerstandsfähig gegen Aethylester bezeichnen.

Stamm 93:

Die Verhältnisse waren hier wie bei Stamm 7.

Oberhefe 25:

Die Proben mit einem Esterzusatz unter 1% begannen und beendigten ihre Gärung zur selben Zeit, wie der B. V. und zeigten gleich starke Absätze. Bei den höheren Konzentrationen, die bis 3% angingen, wirkte der Esterzusatz im Verhältnis seiner Menge verzögernd auf Wachstum und Gärung ein, der Umfang der entstandenen Absätze war aber äußerlich demjenigen des B. V. gleich. Das Letztere gilt auch von den Konzentrationen mit 4% Esterzusatz, die ab und zu noch ein kräftiges Wachstum aufwiesen, während ein Zusatz von 5% Ester tötlich wirkte. Die Widerstandsfähigkeit dieser Hefe war also die gleiche, wie bei den beiden Stämmen 7 und 93. Die zeitliche Differenz zwischen den verschiedenen Gärungsendterminen betrug 7 Tage.

Oberhefe 170:

Verhielt sich wie Oberhefe 25.

Wilde Hefe 811:

Auch hier fielen Beginn und Ende der Gärung bei den Konzentrationen unter 1% mit den Terminen zusammen, die für den B. V. galten. Die höheren Konzentrationen riefen

wieder eine Verzögerung hervor. Ein Angehen erfolgte bis 3% Esterzusatz, bei 4 und 5% hing dasselbe von Zufälligkeiten ab. Die Stärke der Absätze entsprach überall so ziemlich dem B. V., mit Ausnahme einer angegangenen Probe mit 5% Esterzusatz. Hier bildete sich nur ein sehr kleiner Absatz, der aus wenigen, fest zusammengeballten Kolonien bestand, während in den andern Proben die Absätze locker und reichlich auflagen. Ein besonderes Aussehen zeigten die Zellen dieser Kolonien bei der mikroskopischen Untersuchung nicht. Bei dieser Hefe wurde ausserdem noch eine andere auffällige Erscheinung festgestellt: Von zwei Proben, die beide 5% Esterzusatz enthielten, war eine angegangen, die andere nicht. Beide standen 16 Tage unter Beobachtung. Als die eine auch dann noch unverändert blieb, beschickte ich sie — nach Abgiessen der esterhaltigen Lösung — mit frischer steriler Würze und erzielte dadurch starkes, normales Wachstum. Die Hefe hatte sich also trotz der 16 Tage dauernden Einwirkung des Esters lebensfähig erhalten und als sehr widerstandsfähig gegen den Aethylester erwiesen.

Saccharomyces pastorianus:

Die niederen Konzentrationen unter 1% hielten gleichen Schritt mit dem B. V., die höheren wiesen die gewöhnliche Verzögerung auf. Ein Angehen erfolgte bis zu einem Zusatz von 3% Ester, bei 4 und 5% war dasselbe unsicher. Die entstandenen Absätze standen mit Ausnahme der 5% Ester enthaltenden Konzentration in ihrer Menge nicht oder kaum hinter dem B. V. zurück. Die durch den Ester hervorgerufene „Verzögerungsdauer", das heisst die zwischen dem Gärungsende der niedersten und dem der höchsten Konzentration liegende Zeit, betrug 5 Tage. Sacch. pastorianus ist also ziemlich widerstandsfähig gegen den Ester.

Saccharomyces ellipsoideus:

Zeigte dasselbe Verhalten wie Sacch. pastorianus.

Steinberg 1892:

Bei dieser Weinhefe begann und endigte die Gärung in den niederen Konzentrationen um einen Tag später, als beim B. V. In diesem Fall schien der Ester schon in den niederen Konzentrationen eine, wenn auch nur geringe, Verzögerung zu veranlassen. Bei den höheren Konzentrationen war diese Verzögerung deutlicher wahrnehmbar, obgleich der Anfang der Gärung mit steigender Konzentration ziemlich rasch aufeinander folgte. Diese Tatsache spricht dafür, daß sich die Hefe rasch an den Ester gewöhnt. Sie ging bis 4% mit starken Absätzen an, 5% Ester wirkten tötlich. Ihre Widerstandsfähigkeit gegen

Aethylester ist also bedeutend; die durch den Ester hervorgerufene Verzögerungsdauer betrug nur 3 Tage.

Schloss Johannisberg:

Die zweite Weinhefe dieser Versuchsreihe verhielt sich annähernd gleich, wie die erste.

Mykoderma decolorans:

Bei dieser hautbildenden Form wurde die Wahrnehmung gemacht, daß der zugeführte Ester fördernd wirkte. Dies zeigte sich daran, dass schon einen Tag nach der Impfung auf der Oberfläche der Konzentrationen unter 1% eine ziemlich kräftige weisse Haut sichtbar war, während der B. V. erst kleine, matte Hautinselchen aufwies. Die in den mit Ester versetzten Proben entstandene Haut gedieh auffallend rasch und bildete in Bälde sehr charakteristische, grobe, strangartige Falten. Am 5. Tag nach der Impfung war in den Konzentrationen von 0,01—0,75% keine nennenswerte Veränderung mehr festzustellen. Dabei bestand zwischen den zwei niedersten Konzentrationen mit 0,01 und 0,03% Estergehalt und dem B. V. die grösste Aehnlichkeit, sowohl in bezug auf die weißliche Färbung, als auch besonders in bezug auf Stärke und nicht übertriebene Faltung der Haut. In allen andern Fällen, auch in den höheren Konzentrationen, die mit nur geringer Verzögerung noch bei einem Zusatz von 4% Ester hervorragend gediehen, war die gebildete Haut kräftiger und von einer mehr gelblichen Farbe, als beim B. V.; besonders auffallend aber waren die bereits erwähnten, äusserst groben, strangartigen Falten. Die Mykoderma muss daher als ausserordentlich widerstandsfähig gegen Aethylester, ja bis zu einem gewissen Grade als Liebhaberin desselben bezeichnet werden, umsomehr, als die durch Zufügung des Esters hervorgerufene Verzögerungsdauer nur drei Tage betrug.

Willia anomala Hansen:

Auch bei dieser hautbildenden Form übte der zugefügte Ester eine schon äußerlich deutlich wahrnehmbare günstige Wirkung aus. In den niederen Konzentrationen begann und endigte zwar die Hautbildung ungefähr zu gleicher Zeit, wie beim B. V., doch war die Haut in den mit Ester versetzten Proben entschieden kräftiger und die Faltenbildung gröber, als beim B. V. In den höheren Konzentrationen wirkte der Ester nur mässig verzögernd. Die Differenz zwischen dem Gärungsende der niedersten und der höchsten Konzentration, die 4% Ester enthielt, betrug nur 4 Tage. Die Hautbildung in den höheren Konzentrationen konnte rein äußerlich nicht mit unbedingter Sicherheit für stärker als der B. V. angesprochen werden, doch war die Faltung unter dem Einfluss des Esters auch hier

entschieden kräftiger und gröber. Die Willia anomala Hansen muß als außerordentlich widerstandsfähig gegen den Ester bezeichnet werden.

Torula 2:

Diese Form, die erst nach verhältnismässig langer Zeit zur Hautbildung kommt, wurde aus diesem Grunde einer 24tägigen Beobachtung unterworfen. In den niederen Konzentrationen unter 1% begann die Hautbildung ungefähr zur selben Zeit, wie beim B. V.; nach einer Woche war der Stand des Wachstums so, daß die Hautbildung von 0,01 —0,25% etwas schwächer, die von 0,5—0,75% etwas stärker erschien, als beim B. V. Die Kulturen mit höherem Estergehalt, die bis 4% angingen, waren stark zurück, der Ester wirkte also hier in besonders hohem Maße verzögernd. Am Schlusse der Beobachtung sah man in allen angegangenen Proben eine mäßig starke, schmierig-gelbliche Haut, die jedoch meist nicht ganz zusammenschloß, sondern Lücken aufwies. Infolgedessen konnte man auch über ihre Stärke in den verschiedenen Fällen nicht viel sagen. Am besten ausgebildet erschien die Hautbildung in den Konzentrationen 0,25—0,75%.

Torula 3:

In den niedersten Konzentrationen, die 0,01—0,25% Ester enthielten, begann die Hautbildung zu gleicher Zeit mit dem B. V. Sie bedeckte die Oberfläche der Nährlösung zwar erst einen Tag später völlig, als beim B. V., dafür war sie aber zweifellos dicker und gröber gefaltet, als dort. Ebenso war der Farbton der Haut in den niederen Konzentrationen etwas mehr gelblich, als beim B. V. Von einer Beeinträchtigung der Vermehrung konnte man nicht mit Sicherheit sprechen. In den höheren Konzentrationen verursachte der Ester wieder deutliche Verzögerung, ein Wachstum der Kulturen erfolgte noch mit 4% Esterzusatz. Die in den mit Ester versetzten Kolben gebildete Haut zeigte eine mehr gelbliche Farbe, als der B. V., und wies gröbere Falten auf, als dieser. Die Verzögerungsdauer betrug 5 Tage, wenn als Maßstab die völlige Bedeckung der Flüssigkeitsoberfläche mit einer Haut angenommen wird. Bemerkt sei jedoch, daß zuweilen bei Sproßpilzen mit Oberflächenvegetation lange Zeit hindurch Lücken in der Haut bestehen bleiben.

Torula 3 ist jedenfalls ziemlich widerstandsfähig gegen den Ester.

Apiculatus Form 1:

In den niederen Konzentrationen fand eine äußerlich wahrnehmbare Wirkung des Esters in keiner Weise statt, bei

den höheren Konzentrationen trat die übliche Verzögerung ein, nach längerem Stehen waren die Absätze in allen Fällen ziemlich gleich. Die Hefe ging mit 5% Esterzusatz noch an, ist also sehr widerstandsfähig gegen Ester.

Apiculatus Form 3:

Trübung und Absatzbildung begannen und endigten in den niederen Konzentrationen zugleich mit dem B. V. Die höheren Konzentrationen, die bis 5% angingen, erlitten die seither beobachtete Verzögerung; die Stärke der Absätze war in den höheren Konzentrationen offensichtlich geringer, als in den niederen. Der Ester beeinflusste also die Vermehrung im Verhältnis seiner Menge. Die Widerstandsfähigkeit dieser Hefe war sehr bedeutend, die Verzögerungsdauer betrug 6 Tage.

Apiculatus Form 4:

Verhielt sich wie Form 1 und 3.

Apiculatus Form 7:

Das Verhalten dieses Organismus entsprach genau dem der drei andern Vertreter der Gattung.

Die Beurteilung der Einwirkung des Essigesters auf die verwendeten 17 Organismen nach äußerlich sichtbaren Erscheinungen ergab somit folgende Gesichtspunkte:

Die Versuchsergebnisse bestätigen die seinerzeit von Will mit 7 Organismen ausgeführten Vorversuche.

In den niederen Konzentrationen, in denen der Ester also nur in geringer Menge vorhanden ist, wirkt er im allgemeinen zum mindesten nicht in ungünstiger Weise auf die Organismen ein. Wohl in allen Fällen übte er eine, wenn auch manchmal nur geringe, fördernde Wirkung auf Vermehrung und Gärung aus.

In den höheren Konzentrationen veranlaßte der Ester eine deutlich sichtbare Verzögerung der Vermehrung und Gärung. Beide wurden meist um so mehr verzögert, je größer der Esterzusatz war. Die Verzögerung erscheint direkt proportional der zugefügten Estermenge.

Bei jedem der verwendeten Organismen gab es für das Wachstum Grenzwerte, die aber meist nicht ganz sicher zu fassen waren. Bis zu einem bestimmten Prozentsatz gingen immer alle Parallelkulturen an, überschritt aber der Esterzusatz dieses Maß, dann wurde das Angehen schwankend und hing offenbar sehr von der Beschaffenheit

und Menge der Einsaat und von Zufälligkeiten ab. Als Maß für die Widerstandsfähigkeit eines Organismus wurde jedoch immer nur diejenige Konzentration genommen, die in allen Parallelversuchen gleichmäßig angegangen war. Ging eine Art nur in einer von mehreren Parallelproben an, so wurde diese Erscheinung zwar gewürdigt, aber bei den Vergleichen nicht weiter in Rechnung gezogen.

Die „Verzögerungsdauer" gibt neben dem Grenzwert, bei welchem noch ein Wachstum eines Versuchsorganismus erfolgte, einen brauchbaren und verhältnismäßig zuverlässigen Maßstab für die Beurteilung der Widerstandsfähigkeit und des Anpassungsvermögens des Organismus ab. Da der Zeitpunkt der Beendigung einer Gärung äußerlich mit verhältnismäßig grösserer Genauigkeit zu beobachten ist, als der Anfang, so wählte man für die Feststellung der Verzögerungsdauer die Differenz in Tagen, die zwischen dem Gärungsende der niedersten und der höchsten Konzentration lag.

Ueber die Quantität der in den verschiedenen Konzentrationen entstandenen Absätze, bezw. der Hautbildung, liess sich äusserlich nicht immer Genaues sagen. Um hier Klarheit zu schaffen, wurden einzelne ausgewählte Organismen der Zählung unterworfen.

Besondere Veränderungen in morphologischer Beziehung, die auf den Einfluss des Esters zurückzuführen gewesen wären, wurden bei dieser Versuchsreihe nirgends beobachtet. Das Aussehen der Zellen war in allen Kulturen, wo überhaupt Wachstum stattgefunden hatte, normal.

Zum Schluss sei hier noch eine kleine Tabelle angefügt, die über das Verhalten der einzelnen Organismen gegen den Ester zahlenmäßigen Aufschluss gibt:

	Stamm 7 Stamm 93	Oberhefe 25 Oberhefe 170	Wilde 811, Pastorianus, Ellipsoideus	Steinberg 1892 Johannisberg	Mykoderma decolorans, Willia anomala Hansen	Torula 2 Torula 3	Apiculatus Form. 1, 3, 4 u. 7.
Wachstumsgrenze bei % Ester	3% (4)	3% (4)	3% (4,5)	4%	4% (5)	4%	5%
Verzögerungsdauer in Tagen	3	7	5—6	3	3—4	5	6

Ordnet man die einzelnen Organismen nach ihrer Widerstandsfähigkeit gegen den Ester, dann ergibt sich folgende Reihenfolge:

5 %: Apiculatus Form 1, 3, 4 und 7.
4 % (5): Mykoderma decolorans. Willia anomala Hansen.
4 %: Steinberg 1892. Schloss Johannisberg. Torula 2. Torula 3.
3 % (4,5): Wilde Hefe 811. Sacch. pastorianus. Sacch. ellipsoideus.
3 % (4): Stamm 7. Stamm 93. Oberhefe 25. Oberhefe 170.

Nach der Verzögerungsdauer geordnet, erhält man folgende Reihe:

3 Tage: Stamm 7. Stamm 93. Steinberg 1892. Schloss Johannisberg. Mykoderma decolorans.
4 Tage: Willia anomala Hansen.
5 Tage: Wilde Hefe 811. Sacch. pastorianus. Torula 3.
6 Tage: Sacch. ellipsoideus. Apiculatus Form 1, 3, 4 und 7.
7 Tage: Oberhefe 25. Oberhefe 170.

Man ersieht hieraus, daß die hautbildenden Formen Mykoderma decolorans und Willia anomala Hansen sich sehr widerstandsfähig erwiesen haben, da sie reichliche Mengen des Esters vertrugen und nur wenig in ihrer Vermehrung gehemmt wurden.

Mit zu den widerstandsfähigsten unter den verwendeten Organismen gehören entschieden sämtliche 4 Apiculatushefen. Sie gehen alle mit 5 % Esterzusatz noch an, wobei die verhältnismäßig bedeutende Verzögerungsdauer von 6 Tagen nicht allzusehr ins Gewicht fällt, da sie ja an sich zu den langsam wachsenden Arten gehören.

Die beiden verwendeten Weinhefen Steinberg 1892 und Schloß Johannisberg scheinen sich offenbar leicht in die veränderten Lebensbedingungen zu fügen und in ihrer Vermehrung wenig durch den Ester gehemmt zu werden.

Interessant ist besonders das Verhalten des sonst ziemlich empfindlichen Stamm 7, der sich rasch an den Ester gewöhnt und wie die beiden Oberhefen den immerhin bedeutenden Zusatz von 3 % noch erträgt.

Die naheliegende Annahme, daß die in zahlreichen Literaturstellen als typische Esterbildner bezeichneten Hefen und Sproßpilze weniger em-

pfindlich gegen Aethylester sein müßten, sich zum mindesten aber rascher als die andern Arten auch an größere Mengen desselben gewöhnen würden, hat sich im allgemeinen bestätigt.

Dagegen sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe in keiner Weise eine Stütze für die Annahme Lindners und Delbrücks, nach welcher den Estern die Bedeutung von Kampfstoffen zukommt. Denn Stoffe, die von den verschiedensten Organismen in so bedeutenden Mengen ohne Schädigung ertragen werden, können schon deshalb keine Kampfmittel in Delbrück'schem Sinn sein, weil sie bei der natürlichen Gärung in der Regel ja nur in sehr kleinen Mengen gebildet werden.

Ebenso ist es nach den Versuchsergebnissen sehr unwahrscheinlich, daß bei dem Konkurrenzkampf zwischen Apiculatusformen und Kulturhefen der von ersteren erzeugte Ester — wenigstens soweit hier der Aethylester in Frage kommt — die Vermehrung der konkurrierenden Hefen zurückhält, wie Lindner annimmt.

In fast allen Fällen dürfte die allgemeine Regel ihre Bestätigung gefunden haben, nach der geringe Mengen eines Giftes — als solches wirkt der Ester wenigstens in hohen Konzentrationen zweifellos — anregend, größere aber hemmend und schließlich tötlich wirken.

Stamm 7 und Stamm 93.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,75 bis 0,5"	0,25 bis 0,01"
nach 2 Tagen	Mäßige Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze	—	—		—	Keine Gärung Schwache Trübung Geringe Absätze	Mäßige Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze	
nach 3 Tagen	Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze		—			Mäßige Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Gärung Starke Absätze	
nach 4 Tagen	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	—		—	Gärungsanfang Schwache Trübg. „ Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	
nach 5 Tagen		—	Geringe Gärung Schwache Trübung Geringe Absätze	Mäßige Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze		
nach 6 Tagen	—	—	Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	Gärung beendigt Klare Lösung Starke Absätze	—		
nach 7 Tagen	—	—	Gärung beendigt Klare Lösung Ziemlich starke Absätze		—	—	—	

Oberhefe 25 und 170.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,75 bis 0,5%	0,25 bis 0,01%
nach 2 Tagen	Geringe Hefenabsätze	—	—	—	—		Ueberall zahlreiche Hefekolonien	
nach 3 Tagen	Lebhafte Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze	—	—	—	Schwache Gärung Starke Trübung Schwache Absätze		Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	
nach 4 Tagen	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	—	—	—	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze		Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	
nach 6 Tagen	—	—	—	Einzelne Kolonien	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Starke Absätze		—	
nach 8 Tagen	—	—	Lebh. Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	—		—	
nach 11 Tagen	—	—	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Ziemlich starke Absätze		—		—	

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,75 bis 0,5%	0,25 bis 0,01%
nach 2 Tagen	Schwache Gärung Starke Trübung Geringe Absätze	—		—		—	Schwache Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze	
nach 3 Tagen	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	—				Schwach. Gärung Starke Trübung Schwach. Absatz.	Lebhafte Gärung Starke Trübung Sehr starke Absätze	
nach 4 Tagen	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung	—		Mäßige Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze		Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	
nach 5 Tagen	—	—		Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze		Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Starke Absätze	—	
nach 7 Tagen	—	Lebhafte Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze		Gärung beendigt Klare Lösung Starke Absätze		—		
nach 9 Tagen	—	Gärung beendigt Klare Lösung Mäßige Absätze		—		—		

Steinberg 1892 und Schloss Johannisberg.

Zeit	B. V.	5 %	4 %	3 %	2 %	1 %	0,75 bis 0,5 %	0,25 bis 0,01 %
nach 2 Tagen	Schwache Gärung Starke Trübung Schwache Absätze	—	—		—		Vereinzelte Hefekolonien	
nach 3 Tagen	Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	—					Schwache Gärung Starke Trübung Schwache Absätze	
nach 4 Tagen	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung	—	—		Ziemlich lebhafte Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze		Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	
nach 5 Tagen		—	Schwache Gärung Starke Trübung Schwache Absätze		Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze			
nach 6 Tagen			Lebhafte Gärung Starke Trübung Ziemlich starke Absätze		Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Starke Absätze			
nach 8 Tagen			Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Ziemlich starke Absätze					

Mykoderma decolorans und Willia anomala Hansen.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,75 bis 0,5%	0,25 bis 0,01%
nach 2 Tagen	Schwache matte Haut mit vielen Lücken	—	—		—	Kleine Hautinselchen	Kräftige, weisse Haut mit zahlreichen Falten über die ganze Oberfläche	
nach 3 Tagen	Ziemlich kräftige, weiße Haut über die ganze Oberfläche	—	—		Vereinzelte matte Hautinselchen	Oberfläche halb bedeckt von matter Haut	Kräftige Haut mit gelblichem Farbton Grobe Faltung	
nach 4 Tagen	Kräftige, weißliche Haut mit zahlreichen Falten	—	—		Ungefähr 3/4 der Oberfläche bedeckt von matter, dünner Haut	Oberfläche fast ganz bedeckt von weißlicher Haut. Beginnende Faltung	Sehr kräftige, gelbliche Haut über die ganze Fläche mit groben, strangartigen Falten	
nach 6 Tagen	—	Matte Hautinselchen	Zahlreiche matte Hautinselchen auf der Oberfläche verteilt		Kräftige, gelbliche Haut mit groben Falten		—	
nach 8 Tagen	—	Sehr kräftige, gelbliche Haut mit zahlreichen groben Falten			Sehr kräftige, gelbliche Haut mit zahlreichen groben Falten			

Torula 2.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,75 bis 0,5%	0,25 bis 0,01 %
nach 2 Tagen	Ganz geringe Hautbildung	—	—	—	—		—	Gelbliche Inselchen
nach 3 Tagen	Hautinselchen über die ganze Oberfläche verteilt		-	—	—	—	Vereinzelte gelbliche Haut-inselchen	Hautinseln über die ganze Oberfläche
nach 6 Tagen	Schmierig gelbliche Haut Ringbildung	—	—	—	Kleine Hautinselchen sichtbar		Oberfläche bis auf einige Lücken mit schmierig-gelblicher Haut bedeckt	
nach 10 Tagen	Stärke der Haut wie bisher. Starker Ring.	—	—	Beginnende Hautbildung	Ueberall ziemlich starke Hautbildung über die ganze Fläche mit zahlreichen Lücken. Am Rand bildete sich ein ziemlich starker Ring.			
nach 15 Tagen	—	—	Ganz geringe Hautbildung	Schmierig gelbliche Haut Ringbildung	—			
nach 24 Tagen	—	—	Ziemlich starke Haut. Am Rand Ringbildung	—				

Torula 3.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,75 bis 0,5%	0,25 bis 0,01%
nach 2 Tagen	Mäßige Hautbildung	—	—	—	—	—	—	Kräftige, weiße Haut mit schwachen Falten
nach 4 Tagen	Kräftige weiße Haut mit starken Falten					Einzelne Hautinselchen	Ueberall kräftige, weiße Haut mit starken Falten. Stärker als B. V.	
nach 6 Tagen	—		—		—	Schwache, weiße Haut über die ganze Oberfläche	Kräftige, weißliche Haut mit grober Faltung	
nach 8 Tagen	—	—	Ueberall einzelne weiße Hautinseln			Kräftige, weißliche Haut mit groben Falten	—	
nach 11 Tagen	—	—	Kräftige, weißliche Haut mit grober Faltung					

Apiculatus Form 1, 3, 4 und 7.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,75 bis 0,5%	0,25 bis 0,01%
nach 2 Tagen	Schwache Trübung Schwache Absätze	—	—	—		—	Schwache Trübung Starke Absätze	
nach 4 Tagen	Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	—	—	—	Schwache Trübung Einzelne Kolonien	Starke Trübung Ziemlich starke Absätze	Starke Trübung Starke Absätze	
nach 6 Tagen	Nachlassen der Trübung Sehr starke Absätze	Vereinzelte Kolonien		Geringe Trübung Schwache Absätze	Starke Trübung Starke Absätze	Nachlassen der Trübung Sehr starke Absätze		
nach 12 Tagen	—	Keine Trübung mehr sichtbar Starke Absätze			—	—		

2. Beobachtung der Einwirkung nach Zählungen.

Da die Beobachtung der in den Versuchskulturen unter dem Einfluss der verschiedenen Estermengen entstandenen Absätze bezw. Hautbildung zu ungenau war, um einen sicheren Schluß auf die Beeinflussung der Vermehrung der Organismen zuzulassen, wurde der Versuch mit einigen Vertretern verschiedener Gruppen wiederholt und die Vermehrung in den einzelnen Konzentrationen mit der Thoma'schen Zählkammer verfolgt.

Die Wahl fiel auf folgende 6 Organismen:

Stamm 7	Oberhefe 170
Stamm 93	Wilde Hefe 811
Oberhefe 25	Apiculatus Form 3.

Angesetzt wurden die Konzentrationen 0,06. 0,5. 1. 2. 3. 4. und, wo angegangen, 5%. Die eingeimpften Kulturen waren frisch und kräftig, ihr Alter betrug 2 Tage. Die Zählungen wurden nach den im Abschnitt „Versuchsanstellung" angegebenen Grundsätzen meist zweimal täglich ausgeführt und ergaben nach den darüber geführten Tabellen folgende Resultate:

Stamm 7:

Schon bei der nach 31 Stunden vorgenommenen Zählung war die Zahl der Zellen — immer auf die Einheit berechnet — in den mit 0,06 und 0,5% Ester versetzten Kolben größer als beim B. V. Es fand also zweifellos in den niederen Konzentrationen eine direkte Förderung der Vermehrung durch den Ester statt.

Bei den höheren Konzentrationen 1 und 2% trat nach anfänglicher, durch den Esterzusatz hervorgerufener Verzögerung der Vermehrung eine Förderung derselben ein, nachdem die Hefe genügend Zeit gehabt hatte, sich an die ungünstigen Lebensbedingungen zu gewöhnen. Dies zeigte sich darin, daß bei der nach 97 Stunden vorgenommenen Zählung die Zahl der Zellen in der Zähleinheit bei den Konzentrationen bis zu 2% größer war, als die des B. V.

Bei den höchsten angegangenen Konzentrationen 3 und 4% wirkte der Ester nach jeder Hinsicht hemmend und verzögernd: Vermehrung und Gärung setzten spät ein, die Zahl der Zellen in der Zähleinheit des B. V. wurde nicht erreicht.

Nach diesen Ausführungen scheint es für diese Hefe eine optimale Estermenge zu geben, welche die Konzentrationen unter 1 % darstellen.

Stamm 93:

In den niedersten Konzentrationen unter 1 % fand eine etwas geringere, als bei Stamm 7, aber doch deutlich wahrnehmbare, direkte Förderung durch den Ester statt.

In den höheren Konzentrationen fand zuerst eine Hemmung der Vermehrung, dann aber eine Förderung derselben statt, die aber nur bis 1 % Esterzusatz reichte.

Die höchsten Konzentrationen erlitten eine deutliche Hemmung durch den Ester, die Zellenzahl war kleiner, als die des B. V.

Die optimale Estermenge wurde auch hier durch die Konzentrationen unter 1 % dargestellt.

Oberhefe 25:

In den niederen Konzentrationen unter 1 % ergab sich wieder eine direkt fördernde Wirkung des Esters, da die Zellenzahl der Zähleinheit dort von der ersten Zählung an größer war, als beim B. V.

Die Konzentration 1 % wies erst Hemmung, dann aber Förderung auf.

In den höheren Konzentrationen 2—4 % fand eine mit wachsendem Estergehalt zunehmende, starke Hemmung statt, die Zähleinheit des B. V. wurde nicht mehr erreicht.

Die optimale Estermenge lag bei den niedersten Konzentrationen unter 1 %.

Oberhefe 170:

Diese Hefe war, wie die Tabelle zeigt, ziemlich empfindlich gegen den Ester, da die Zellenzahl der Zähleinheit des B. V. in keinem Fall erreicht wurde. Die Schlussfolgerung aus den Beobachtungen der äußeren Erscheinungen, nach der diese Hefe widerstandsfähiger schien, als Oberhefe 25, war also irrig.

Wilde Hefe 811:

Bei dieser Hefe fand durch den Ester allgemein eine Verzögerung der Vermehrung, und zwar auch in den niederen Konzentrationen, statt. Es dauerte ziemlich lange, bis die Hefe sich an den Ester gewöhnte, dann aber wirkte derselbe stark fördernd und zwar bis zu der Konzentration mit 4 % Estergehalt.

Die einzige Konzentration, die den B. V. an Stärke des Absatzes nicht übertraf, war die mit 5 % Esterzusatz.

Apiculatus Form 3:

Diese an sich ziemlich langsam wachsende Art brauchte lange zur Anpassung an den Ester, dann aber überflügelten die Konzentrationen 0,06—0,5% den B. V. und stellten so die optimale Estermenge dar.

Die Konzentration mit 1% Esterzusatz hielt sich auf der Höhe des B. V., während die höheren Konzentrationen 2 bis 5% starke Verzögerung hervorriefen und die Vermehrung schädigten.

Faßt man die Ergebnisse der Zählungen zusammen, so führen sie zu folgenden Schlußfolgerungen:

Mit Ausnahme der Oberhefe 170 haben die Zählungen die aus den Beobachtungen der äußeren Erscheinungen gezogenen Schlüsse bestätigt.

Gleichmässig gilt für alle Versuche, daß erst bei den höheren Konzentrationen (etwa von 2% ab) eine wirkliche Hemmung stattfindet, d. h. eine Hemmung, die auch später nicht mehr eingeholt wird. Unterhalb der Konzentration von 1% findet vielfach eine direkte Förderung durch den Ester statt, jedoch verhalten sich in dieser Beziehung verschiedene Hefen verschieden. Eine ursprüngliche, kurzdauernde Hemmung, die sich da und dort bemerkbar macht, ist darauf zurückzuführen, daß sich die Zellen erst anpassen müssen. Den Annahmen Lindners und Delbrücks von der Kampfstoffnatur der Ester bei natürlichen Gärungen, widersprechen die Zählergebnisse ebenso, wie die Ergebnisse der Beobachtung der äußeren Erscheinungen. Denn ein Umsatzprodukt, das die Vermehrung einer Hefe nicht nur nicht aufhält, sondern direkt fördert, kann allein nicht als Schutz- und Kampfmittel in Frage kommen, wenn zwei Hefen, z. B. ein Apiculatus und Bierhefe, miteinander konkurrieren. Die Mengen des Esters, der direkt hemmend wirkt, sind zu groß, als daß sie praktisch in Frage kämen.

Stamm 7. Zähleinheit 0,022 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	1%	2%	3%	4%
nach 24 Std.	1,24	—	—	—		—	—
31 Std.	2,98	3,41	4,59	2,75	—	—	—
49 Std.	16,53	17,85	16,45	18,56	3,01	—	—
56 Std.	18,43	19,94	17,00	20,53	7,60	0,91	—
72 Std.	26,92	30,54	34,17	22,94	19,40	2,41	0,09
79 Std.	27,08	31,80	35,60	26,32	19,88	4,76	0,36
97 Std.	28,02	32,82	35,64	31,02	29,10	15,76	6,36
103 Std.	—	—	—	—	29,98	21,24	20,70
120 Std.	—	—	—	—	—	23,68	21,54
	—	—	—	—	—	—	—

Stamm 93. Zähleinheit 0,034 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	1%	2%	3%	4%
nach 24 Std.	4,01	3,21	3,75	3,67	1,03	–	—
31 Std.	6,80	5,28	8,56	8,78	2,98	0,15	—
49 Std.	16,66	17,08	19,53	20,58	15,19	11,34	—
56 Std.	18,59	23,21	25,52	21,56	17,05	12,76	0,15
72 Std.	21,07	23,99	26,85	22,71	18,01	13,79	4,31
79 Std.	23,01	24,31	29,89	23,43	18,81	15,84	8,69
97 Std.	–	—	—	—	21,45	22,66	18,70
103 Std.	—	—	—	—	21,76	22,88	19,01
	—	—	—	—	—	–	—
	—	—		—	—	—	–

Oberhefe 25 Zähleinheit: 0,026 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	1%	2%	3%	4%
nach 24 Std.	0,66	1,03	1,07	0,51	—	—	—
41 Std.	9,35	14,63	13,53	6,60	—	—	—
47 Std.	12,76	16,06	17,16	11,77	—	—	—
65 Std.	17,38	19,40	19,80	15,51	—	—	—
71 Std.	22,55	24,09	23,43	18,59	1,50	—	—
89 Std.	24,20	24,42	28,62	30,99	9,68	0,60	—
95 Std.	24,91	25,20	28,96	31,08	14,74	5,98	0,24
119 Std.	—	—	—	—	19,03	12,10	8,54
129 Std.	—	—	—	—	22,01	19,80	17,34
140 Std.	—	—	—	—	22,31	20,01	18,07

Oberhefe 170 Zähleinheit: 0,027 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	1%	2%	3%	4%
nach 24 Std.	0,15	0,18	0,23	—	—	—	
41 Std.	1,02	0,72	0,92	—	—	—	
47 Std.	2,82	3,90	2,58	1,01	—	—	—
65 Std.	16,94	17,16	13,42	7,04	—	—	—
71 Std.	28,93	20,57	15,73	12,65	0,30	—	—
89 Std.	29,66	21,34	16,39	21,01	0,54	0,18	—
95 Std.	—	—	—	—	12,76	6,56	—
119 Std.	—	—	—	—	17,76	13,44	—
129 Std.	—	—	—	—	18,90	17,80	—
140 Std.	—	—	—	—	—	18,01	—

Wilde Hefe 811. Zähleinheit: 0,027 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	1%	2%	3%	4%	5%
nach 24 Std.	2,42	2,36	1,88	2,71	—	—	—	—
31 Std.	13,15	11,26	10,76	11,65	3,54	2,78	2,67	-
42 Std.	27,28	22,11	24,09	18,15	19,03	16,50	19,25	—
49 Std.	29,48	23,76	24,42	28,49	21,12	18,59	18,26	0,60
66 Std.	30,80	29,37	29,70	35,98	36,41	41,80	42,68	9,13
95 Std.	31,84	42,40	39,36	41,28	38,56	43,56	43,36	23,04
108 Std.	—	42,18	40,72	41,50	38,97	43,45	43,27	25,06
		—	—	—	—	—	—	-
	—		—	—	—	—	—	—
		-	—	—	—	—	—	—

Apiculatus Form 3. Zähleinheit 0,004 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	1%	2%	3%	4%	5%
nach 24 Std.	7,31	3,68	4,02	2,97	—	—	—	—
31 Std.	14,66	12,01	13,10	8,76	3,25	1,79	1,23	—
42 Std.	24,55	22,55	22,88	20,57	13,64	10,78	8,03	1,24
49 Std.	28,56	29,99	30,62	30,01	17,12	16,45	15,76	5,68
66 Std.	39,12	48,99	49,10	38,17	26,34	21,36	20,01	18,76
95 Std.	40,00	50,88	50,40	39,36	29,44	25,60	25,12	24,16
108 Std.	—	—	—	40,18	31,76	28,26	26,03	25,20
	—	—	—	-	—	—	—	—
	-		—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—

IV. Essigsäureäthylester als Kohlenstoffquelle für verschiedene Hefen und andere Sproßpilze in rein mineralischer Nährlösung.

Die erste Veranlassung zu den vorliegenden Versuchen waren unsere Beobachtungen, welche bei den Versuchen über die Einwirkung von Essigsäureäthylester auf in Bierwürze befindliche Organismen gemacht wurden und erkennen ließen, daß der Ester unter gewissen Umständen fördernde Wirkung auf deren Vermehrung ausübe. Dazu kamen weiter Mitteilungen ähnlicher Art von Ehrlich[1]) und Lindner[2]), der die schon früher gemachte Beobachtung[3]), nach der es Hefen gibt, die imstande sind, den zum Zellaufbau nötigen Kohlenstoff dem Aethylalkohol zu entnehmen, in einfacher Weise demonstrierte.

Bei der Versuchsanstellung in dieser Richtung wurden die zu untersuchenden Hefen und Sproßpilze in eine stickstoffhaltige, aber absolut kohlenstoffreie Nährlösung eingeimpft und dieser Lösung als einzige Kohlenstoffquelle Ester in verschiedenen Abstufungen zugefügt. In jedem Fall, in dem die Einsaaten in der mit Ester versetzten, rein mineralischen Nährlösung angingen, war schon äußerlich der Beweis geliefert, daß es der eingeimpften Art möglich gewesen sein mußte, den ihr unentbehrlichen Kohlenstoff dem zugefügten Ester zu entnehmen, da ja sonst kein kohlenstoffhaltiger Bestandteil in der Nährlösung vorhanden war. Die während der Versuche gemachten Aufzeichnungen erstrecken sich sowohl auf die äußeren Erscheinungen des Wachstums der Einsaat, als auch auf die am Ende des Versuchs mit Hilfe des Mikroskops gemachten Wahrnehmungen in morphologischer Beziehung. Die Feststellung der Veränderungen, die der Ester bei der Aufnahme durch die Organismen in chemischer Beziehung erleidet, wurde einer besonderen Versuchsreihe vorbehalten.

Wie bei den früheren Versuchen wurden auch hier kleine, mit Watte verschlossene Kolben verwendet, die alle das gleiche Flüssigkeitsvolumen von 50 ccm enthielten. Die Grundnährlösung war folgendermassen zusammengesetzt:

[1]) Ehrlich, F. Biochemische Zeitschrift 36. S. 477.
[2]) Lindner, P. Wochenschr. f. Brauerei 1912. 29. S. 1.
[3]) Siehe Einleitung.

1% $(NH_4)_2SO_4$; 0,3% $MgSO_4$; 0,8% KH_2PO_4; 0,05% KCl in destilliertem Wasser gelöst.

Als Vergleichsversuche dienten Kolben, die als Kohlenstoffquelle 10% Dextrose enthielten; der B. V. enthielt nur die rein mineralische Lösung. Die Versuche standen bei Zimmertemperatur (18—22°).

Ein orientierender Vorversuch[1]) mit hautbildenden Organismen führte nach kurzem Stehen überraschender Weise zu dem Schluss, daß es tatsächlich Hefen und Sproßpilze geben muß, die imstande sind, ihren Kohlenstoffbedarf aus Aethylester zu decken und dabei teilweise noch gut gedeihen. Infolgedessen wurden die Hauptversuche mit folgenden Aethylesterzusätzen angesetzt: 0,06. 0,25. 0,5. 1. 2. 3. 4 und 5%.

Zur Untersuchung gelangten beim Hauptversuch folgende 21 Organismen:

Stamm 7	Willia anomala var. II Steuber
Stamm 93	Willia anomala Hansen
Oberhefe 25	Apiculatus Form 3
Oberhefe 170	Apiculatus Form 4
Sacch. pastorianus	Torula 2
Sacch. ellipsoideus	Torula 3
Wilde Hefe 811	Torula 12
Steinberg 1892	Torula 15
Schloss Johannisberg	Pichia membranaefaciens
Mykoderma valida	Sachsia suaveolens.
Mykoderma decolorans	

Die Menge der Einsaat betrug in allen Fällen je eine Platinöse voll Absatz oder Haut, je nach Art des Organismus. Die Kulturen waren kräftig und 3 Tage alt, die Beobachtungszeit betrug 40 Tage.

Im Folgenden seien die Erscheinungen bei den einzelnen Organismen ausführlich mitgeteilt, eine kurze Zusammenfassung der wesentlichen Punkte, sowie die zugehörigen Tabellen, befinden sich am Schluss dieses Kapitels.

Stamm 7:

Die Hefe wuchs in den mit Dextrose versetzten Vergleichsversuchen zwar ziemlich langsam, erreichte aber darin starke Absätze. In den Kolben, die den B. V. darstellten, in denen ihr also keinerlei Kohlenstoff zur Ernährung dargeboten war, kam sie merkwürdiger- und unerwarteterweise ebenfalls

[1]) Vergl. die vorläufige Mitteilung, Zeitschr. für das ges. Brauwesen 1912. 35. S. 128.

fort, brachte es aber nur zu sehr geringen Absätzen. Bis zu einem Zusatz von 3% Ester ging sie an, bei 4% war ein Angehen zweifelhaft, 5% wirkten tötlich. Wir haben also hier in bezug auf die Esterwirkung ähnliche Erscheinungen, wie sie schon bei den Versuchen beobachtet wurden, die sich mit den durch den Ester hervorgerufenen äußeren Erscheinungen bei gehopfter Bierwürze als Nährlösung befaßten, nur mit dem Unterschied, dass hier das Wachstum allgemein viel langsamer von statten ging und daher eine längere Beobachtungszeit nötig war. Auch sonst traten Analogien mit der früheren Versuchsreihe auf, es wurde nämlich auch hier eine verzögernde Wirkung des Esters beobachtet, die mit zunehmender Menge wuchs. Als neues Moment tritt hinzu, daß offenbar eine gewisse Mindestmenge von zugefügtem Ester vorhanden sein mußte, um überhaupt ein Wachstum zu ermöglichen. Darauf deutet die sowohl bei Stamm 7, als auch in andern Fällen beobachtete Tatsache hin, nach der in den Kolben mit 0,06% Estergehalt kein Wachstum auftrat, also der in dieser geringen Menge vorhandene Kohlenstoff nicht zu genügen schien, um ein Wachstum zu ermöglichen. Diese Erscheinung ist deshalb umso merkwürdiger, weil — wie oben erwähnt — in den Kolben ohne jeden Kohlenstoffgehalt Wachstum zustande kam. Eine Erklärung dieser Erscheinung soll am Schluss dieser Ausführungen versucht werden.

Das beste Wachstum trat in den Kolben mit 1—3% Esterzusatz auf, es gab also offenbar auch hier eine optimale Estermenge.

In der Stärke blieben die Absätze der mit Ester versetzten Kolben erklärlicherweise hinter den Dextrosekolben zurück, übertrafen dagegen den B. V. in allen Fällen. Unter sich verglichen kann man sagen, daß die Absätze in den niederen Konzentrationen zunächst mit zunehmender Estermenge wuchsen, in den mittleren ein gewisses Höchstmaß erreichten und gegen die Grenzkonzentrationen zu wieder geringer wurden.

Nach 40tägiger Gesamtbeobachtungszeit wurden die Proben der mikroskopischen Untersuchung unterworfen, wobei sich keinerlei anormale Erscheinungen oder Veränderungen nachweisen ließen. In den angegangenen Proben fanden sich neben kräftigen lebenden viel tote Zellen. Offenbar hat sich auch bei den niederen Zusätzen ein Kampf der Hefezellen um ihre Existenz abgespielt, wobei minderwertige Zellen zu Grunde gingen.

In den Proben mit 0,06% Esterzusatz, sowie in den nicht angegangenen Kolben, fand sich nur die Einsaat vor

und zwar in totem Zustand. Ob die Zellen direkt verhungert sind, oder ob sie dem Ester gegenüber nicht aufkommen konnten, wird später besprochen.

Stamm 93:

In den mit Dextrose versetzten Vergleichskulturen ging das Wachstum zwar ziemlich langsam vor sich, es bildeten sich aber im Lauf der Zeit starke Absätze, während in dem kohlenstofflosen B. V. nur geringe Absatzbildungen auftraten. Die übrigen Erscheinungen stimmten mit den bei Stamm 7 beobachteten überein. Bei einem der Kolben, die 0,06 % Ester enthielten, trat die beachtenswerte Erscheinung auf, daß die Hefe sich einen ganzen Monat lang nicht vermehrte, nach dieser Zeit erst bildeten sich einige Kolonien, deren Zellen jedoch bei der mikroskopischen Prüfung nach 40 Tagen bereits wieder tot waren. Diese Erscheinung erklärt sich möglicherweise so, daß von der Einsaat her sehr wenig Zellen übrig blieben, der Ester reichte nicht aus, um eine größere Vermehrung herbeizuführen. Später kamen dann die Produkte der Autolyse der abgestorbenen Zellen kräftig zur Geltung und bildeten neue Zellen, die sich jedoch unter den gegebenen Verhältnissen auch nicht halten konnten. Von weiteren mikroskopischen Beobachtungen ist nur zu erwähnen, daß bei den Zellen des B. V. die Oelkörperchen auffallend stark hervortraten, was meist ein Zeichen kümmerlicher Ernährung ist.

Oberhefe 25:

Mit Dextrosezusatz trat langsames Wachstum ein, das im Lauf der Zeit aber doch ziemlich starke Absätze erzeugte, während die in den Kolben des B. V. entstandenen nur als schwach bezeichnet werden konnten.

In den niederen Konzentrationen trat — einschließlich 0,06 % — Wachstum ein, das überall Absätze erzeugte, welche die des B. V. in den Konzentrationen 0,25% — 2% übertrafen, während sie in den ganz niederen Konzentrationen hinter dem B. V. zurückblieben. In den hohen Konzentrationen, die bis 3%, teilweise noch mit 4% angingen, trat die übliche Verzögerung ein, auch ließ die Stärke der Absätze nach oben hin wieder nach.

Die mikroskopische Prüfung ergab in der niedersten Konzentration fast nur tote Zellen.

Oberhefe 170:

Mit Dextrose entwickelte die Hefe ziemlich starke Absätze, der B. V. nur schwache.

Bei den niederen Konzentrationen ging die mit 0,06% Esterzusatz nicht an, die übrigen dagegen vermehrten sich mit der entsprechenden Verzögerung und zeigten ziemlich bedeutende Absätze, die in allen Fällen den B. V. übertrafen. In verschiedenen Kolben wurde etwas Oberflächenwachstum beobachtet, auch in höheren Konzentrationen, die bei 3%, oft noch bei 4% Esterzusatz angingen.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte kümmerliche Zellen.

Sacch. pastorianus:

Die mit Dextrose versetzten Kolben zeigten auffallend starkes Wachstum, während in den B. V. Proben nur schwache Absätze entstanden. Die Hefe ging bei 3% Esterzusatz noch an, die verzögernde Wirkung des Esters war nur gering. Die entstandenen Absätze waren durchweg stärker als die des B. V., erreichten aber bei weitem nicht den Vergleichsversuch und ließen wie gewöhnlich nach oben hin nach.

Vom miskroskopischen Befund ist mitzuteilen, daß die Zellen trotz der langen Beobachtungszeit von 40 Tagen noch in sehr gutem Zustand waren. In vielen Fällen — so beim B. V., bei 1%, 0,06% u. a. m. — wurde Sporenbildung beobachtet.

Sacch. ellipsoideus:

Verhielt sich wie Sacch. pastorianus.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die Zellen sich in gutem Zustand befanden. In verschiedenen Kolben wurde Sporenbildung festgestellt, daneben vielfach tote Zellen.

Wilde Hefe 811:

Die mit Dextrose versetzten Proben bildeten allmählich starke Absätze, während der B. V. nur schwache Vermehrung zeigte. Die Hefe ging bis zu einem Esterzusatz von 5% an, von einer verzögernden Wirkung des Esters kann man in diesem Fall kaum sprechen. Die Kolonienbildung war teilweise gleich stark, wie beim Dextroseversuch.

Die auftretenden Absätze waren überall stärker, als die des B. V.

Der mikroskopische Befund ergab, daß die Zellen aller Konzentrationen in auffallend gutem Zustand waren und durchaus normales Aussehen hatten, daneben traf man allerdings überall reichlich tote Zellen. Die Absätze in den Dextrosekolben nahmen allmählich ein rötlich-braunes Aussehen an und entwickelten obstartigen Geruch. Die Kulturen waren rein.

Mykoderma valida:

Diese hautbildende Form kam in den Dextrosekolben sehr gut fort und bildete dort eine sehr starke, faltenreiche Haut, während auf der Oberfläche des B. V. erst nach langer Zeit einige schwache, kleine Hautinselchen entstanden. Daher waren die Hautbildungen in allen Konzentrationen, die bis zu 4% Esterzusatz mit geringer Verzögerung angingen, stärker als beim B. V., erreichten aber in keinem Fall die Oberflächenvegetation der Dextrosekolben. Den seitherigen Beobachtungen entsprechend waren auch hier die Hautbildungen in den niedersten Konzentrationen gering, dann kam ein Wachstumsoptimum, das bei den mittleren Konzentrationen lag, nach oben hin nahm die Stärke der Hautbildung wieder ab.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die lebenden Zellen in allen Konzentrationen in gutem Zustand waren, daneben fanden sich viel tote.

Mykoderma decolorans:

Verhielt sich wie Mykoderma valida.

Willia anomala var. II Steuber:

Diese auf Kirschen vorkommende Art zeigte mit Dextrose üppiges, in dem B. V. dagegen sehr kümmerliches Wachstum. Sie ging mit 4% Ester, oft noch mit 5% an. Die beste Entwicklung der Haut lag bei den mittleren Konzentrationen.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte in den höheren Konzentrationen häufig, in den niedersten vereinzelt auftretende Sporen neben ziemlich zahlreichen toten Zellen.

Willia anomala Hansen:

Mit Dextrose entstand eine kräftige Haut, der B. V. brachte nur kleine Hautinselchen hervor. Diese Willia-Art ging mit nicht großer Verzögerung bis 5% Estergehalt an und verhielt sich wie Willia anomala var. II Steuber.

Die mikroskopische Untersuchung ergab einen sehr guten Zustand der Zellen und in den Konzentrationen über 1% Sporenbildung. In den niedersten Konzentrationen wurden keine morphologischen Veränderungen, aber zahlreiche tote Zellen beobachtet.

Pichia membranaefaciens:

Mit Dextrose entstand eine außerordentlich kräftige, faltenreiche Haut, während in den B. V. Kolben nur geringes Wachstum aufkam. Die Hefe ging mit 4%, manchmal noch mit 5% Esterzusatz an und bildete — ausgenommen die niederste und höchste Konzentration — überall eine ziemlich

kräftige, weiße Haut. Auch sie war also wenig empfindlich gegen den Ester; die durch ihn hervorgerufene Verzögerung der Vermehrung war nur gering.

Die mikroskopische Untersuchung ergab Bemerkenswertes:

In der höchsten Konzentration mit 4% Esterzusatz wurden Sporen gefunden, was eine Seltenheit bei Pichia sein soll. Der B. V. zeigte an den Zellen deutliche Kronenbildung. In der niedersten Konzentration waren die Wachstumserscheinungen normal. Im allgemeinen waren die Zellen in gutem Zustand.

Torula 12:

Mit Dextrose entstand gutes Wachstum und auch in dem B. V. schien sich dieser Sproßpilz leidlich fortzubringen, wenigstens waren die hier beobachteten Inselchen kräftiger als bei den andern hautbildenden Arten. Mit 4% Esterzusatz entstand mit bedeutender Verzögerung noch kümmerliches Wachstum. Am besten ausgebildet war die Haut in den mittleren Konzentrationen, während sie in den niedersten Konzentrationen sehr schwach war.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte die verschiedensten Zellformen, neben gut aussehenden viele tote.

Torula 15:

Verhielt sich dem Ester gegenüber wie Torula 12.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte in einer Konzentration mit 1% Estergehalt Kronenbildung an den Zellen. Im übrigen fanden sich neben gut erhaltenen auch zahlreiche tote Zellen.

Torula 2:

Diese Torula zeigte in den mit Dextrose versetzten Kulturen üppiges, in den kohlenstofflosen B. V. Proben nur minimales Wachstum in Form von geringen Absätzen ohne Hautbildung. Sie ging auch mit 5% Esterzusatz noch an; wie üblich wirkte der zugesetzte Ester verzögernd. Die Haut war in allen Fällen, in denen Ester zugesetzt war, dünn und schwach.

Trotz dieser nicht allzu reichlichen Vermehrung kann man die Torula 2 als ziemlich widerstandsfähig gegen Aethylester bezeichnen, da die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die Zellen nach 40tägigem Dasein in allen mit Ester versetzten Lösungen meist lebend und in sehr gutem Zustand waren.

Torula 3:

Zeigte mit Dextrose ein sehr starkes Wachstum und auch in den V. B. Proben ohne jeden Kohlenstoff kam sie noch leidlich gut fort, während sie in den Kolben, die 0,06% Ester enthielten, nicht anging.

Auch hier wirkte der Ester wie gewöhnlich verzögernd, die auftretenden Absätze erschienen in den niederen Konzentrationen gleich stark, wie die des V. B., in den höheren, die bis zu 2% Esterzusatz angingen, waren sie stärker. Von Hautbildung war — ausser beim Dextroseversuch — nicht viel wahrzunehmen.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die Zellen in allen Proben, die angegangen waren, sich in sehr gutem Zustand befanden; bei 0,06% fand sich nur die tote Einsaat.

Schloß Johannisberg:

Zeigte mit Dextrose starke Absätze, während sie in den B. V. Proben nur kümmerlich fortkam. Diese Weinhefe ging mit der üblichen Verzögerung bis zu einem Zusatz von 2% Aethylester an, bei 3% Ester war ein Angehen ungewiß. Die entstandenen Absätze waren meist bedeutender als beim B. V.

Die mikroskopische Untersuchung ergab in den B. V. Proben Sporenbildung. In allen Fällen, auch in den niedersten Konzentrationen, waren die Zellen in sehr gutem Zustand.

Steinberg 1892:

Bildete mit Dextrose starke, in den B. V. Proben schwache Absätze. Ein Wachstum erfolgte mit geringer Verzögerung bis zu einem Zusatz von 2%, manchmal noch von 3% Ester, die Absätze erschienen bei 0,06% Estergehalt gleich stark, wie die des B. V., in allen andern Fällen waren sie stärker.

Die Hefe kann also, wie die Johannisberg, als ziemlich widerstandsfähig gegen Ester bezeichnet werden, die mikroskopische Untersuchung ergab gut erhaltene Zellen und vielfach Kronenbildung.

Sachsia suaveolens:

Dieser von Lindner[1]) als Weinbukettschimmel bezeichnete Pilz gedieh in der Dextroselösung in ganz hervorragender Weise. Er bildete darin „Rasen“ von weißlicher Farbe und brachte auf der Oberfläche große, weiße, schwammartige, hoch in die Luft wachsende Gebilde hervor. In den B. V. Proben — also ohne jeden Kohlenstoff — gedieh er ebenfalls auffallend gut, jedoch bestand hier — wie auch in allen ester-

[1]) Lindner, P. „Mikroskopische Betriebskontrolle“ 5. Aufl. 1909. Parey-Berlin S. 365.

haltigen Proben — das Wachstum aus den erwähnten „Rasen", während die Vermehrung auf der Oberfläche weniger bedeutend war.

Von einer nennenswerten Verzögerung durch den Ester kann man in diesem Fall nicht sprechen, das Wachstum muß überall als hervorragend bezeichnet werden. Des öfteren wurden die von Lindner erwähnten Myzelfäden beobachtet; die Dextrosekolben wiesen starken, esterartigen Geruch auf.

Bei der mikroskopischen Untersuchung sah man viel Myzel und die charakteristischen, keilförmigen Sproßzellen.

Apiculatus Form 3 und 4:

Zeigten weder im B. V., noch in den mit Ester versetzten Kolben irgendwelches Wachstum.

Betrachtet man den Prozentsatz von zugefügtem Ester, bei dem die einzelnen Organismen noch angingen, als Maß für ihre Anpassungs- und Widerstandsfähigkeit gegen denselben, dann ergibt sich folgende Reihenfolge:

5%: Torula 2. Sachsia suaveolens.
4%(5): Wilde Hefe 811. Sacch. pastorianus. Sacch. ellipsoideus. Willia anomala var. II Steuber. Willia anomala Hansen. Mykoderma decolorans. Mykoderma valida. Pichia membranaefaciens.
4%: Torula 12. Torula 15.
3%(4): Stamm 7. Stamm 93. Oberhefe 25. Oberhefe 170.
3%: Steinberg 1892. Schloß Johannisberg.
2%: Torula 3.
Nicht angegangen: Apiculatus Form 3 und 4.

Diese Zusammenstellung — bei der die eingeklammerten Zahlen wie früher diejenigen Prozentsätze angeben, bei denen das Angehen des betr. Organismus zweifelhaft und wechselnd war — stimmt nicht immer mit der Tabelle überein, die sich am Schluss der Ausführungen über die Wirkung des Esters auf Organismen in gehopfter Bierwürze befindet. Hier, wie dort, zeigte es sich, daß verwandte Arten sich ab und zu gleich gegen den Ester verhalten, oft aber auch von ganz verschiedener Empfindlichkeit gegen ihn sind.

Im allgemeinen hat diese Versuchsreihe sehr interessante Ergebnisse geliefert. Bemerkenswert überhaupt für die Schlußfolgerungen über die Ausnützung des Aethylesters als Kohlenstoffquelle ist die Erscheinung, daß sämtliche, zum Versuch verwendete Organismen imstande waren, schon in der kohlenstoffreien Nährlösung allein fortzukommen. Einige

wiesen darin sogar ein relativ bedeutendes Wachstum auf, so z. B. Pichia, Pastorianus, Torula 2 und Sachsia. Es fragt sich nun vor allem, wie den Organismen in der kohlenstofflosen Lösung ein Fortkommen überhaupt möglich war. Sie mussten doch irgendwoher gewisse Mengen von Kohlenstoff erhalten haben, um sich fortzubringen. Als Kohlenstoffquellen wären denkbar: einmal die Mengen Würze, die bei der Impfung mit in die rein mineralische Lösung hineinkamen. Weiter könnte man vermuten, die Organismen hätten vielleicht den nötigen Kohlenstoff in irgend einer Form aus der Luft bezogen, wie dies z. B. für Alkohol und Stickstoff schon nachgewiesen ist. Eine weitere und letzte Möglichkeit wäre für die Organismen die Verwendung der bei der Autolyse der eingeimpften Zellen sich erschliessenden Kohlenstoffquellen gewesen, da die zur Herstellung der Nährlösung verwendeten Chemikalien absolut rein waren und durch sie kein Kohlenstoff in die Lösung hineinkam.

Daß die bei der Impfung — eine Platinöse voll! — in die Nährlösung gelangten minimalen Würzemengen einen ergiebigen Einfluß auf das Wachstum der Organismen hätten ausüben können, ist nicht wohl anzunehmen. Daß unter den gegebenen Bedingungen aus den neben dem B. V. stehenden Versuchskolben in die Luft übergegangener Esterdampf den Organismen im B. V. als Kohlenstoffquelle gedient hat, erscheint nicht völlig ausgeschlossen.

Unter diesen Umständen müsste man aber doch als sicher annehmen, daß vor allem die hautbildenden Formen, die ja viel mehr mit Luft in Berührung kommen, als die absatzbildenden, ein besseres Wachstum in den B. V. Proben aufzuweisen hätten, als die andern. Eine relativ bedeutende Oberflächenvegetation in den blinden Versuchen haben aber nur Pichia, Sachsia und Torula 3 aufzuweisen, während bei den Mykoderma-, Willia- und den andern Torula-Arten das Wachstum in dem B. V. als sehr kümmerlich bezeichnet werden muß. Dies kann seinen Grund allerdings auch in andern, unbekannten Einflüssen haben. Am meisten hat, auch nach andern Beobachtungen[1]), die Annahme für sich, daß die Organismen die bei dem Absterben von schwächlichen Zellen entstehenden Autolysenprodukte verwendet und sich mit deren Hilfe fortgebracht haben. Völlig befriedigend erscheint allerdings keine der beiden Erklärungen.

Jedenfalls hat der Versuch mit Bestimmtheit ergeben, daß sämtliche verwendeten Organismen

[1]) Kochs Jahresbericht. 1911. 12. S. 133.

imstande waren, ihren Kohlenstoffbedarf aus dem zugeführten Ester zu decken und sich zu vermehren. Das Wachstum in den mit Ester versetzten Kolben war dabei in so ziemlich allen Fällen — mit mehrfacher Ausnahme der 0,06 % Esterzusatz enthaltenden, niedersten Konzentration — bedeutender als beim entsprechenden B. V. Die Vermehrung war allgemein sehr langsam, was seinen Grund darin haben dürfte, daß die mineralische Nährlösung an sich die Vermehrung nicht allzusehr begünstigt und die Organismen, wie schon mehrmals ausgeführt, sich erst der Nährlösung akkomodieren müssen.

Es traten offenkundig vielfach die gleichen Erscheinungen auf, die bei Hefen beobachtet werden, die das Bestreben haben, sich ungünstigen Bedingungen (z. B. höherer Temperatur) anzupassen.

Eine der auffälligsten Erscheinungen dieser Versuchsreihe, im Gegensatz zur ersten, war die Tatsache, daß in manchen Fällen (Stamm 7, Oberhefe 170, Torula 3) die niederste Konzentration mit 0,06 % Estergehalt überhaupt nicht, in den übrigen aber meist in derart kümmerlicher Weise anging, daß sie nicht einmal das fast immer armselige Wachstum des B. V. erreichte. Die Tatsache, daß der kohlenstofflose B. V. anging, die Kohlenstoff enthaltende niederste Konzentration aber nicht, war an sich schon eine rätselhafte Erscheinung, zumal die Einsaat in allen Fällen frisch und kräftig war. Das mikroskopische Bild dieser Kulturen, die sich kümmerlich vermehrt hatten, zeigte am Schluß des Versuchs meist nur tote Zellen. War eine dieser Konzentrationen überhaupt nicht, oder wenigstens nicht in äusserlich sichtbarer Weise angegangen, dann sah man unter dem Mikroskop nur tote Zellen, die der Zahl nach der Menge der Einsaat entsprachen, oder sie nur ganz wenig übertrafen.

Vielleicht läßt sich die Erscheinung folgendermassen erklären: Ob die Einsaat in der gegebenen Nährlösung aufkommt oder nicht, hängt von der Anzahl der eingeimpften Zellen und dem physiologischen Zustand ab. Je weniger empfindlich die Einsaat gegen die störenden Einflüsse der Zusammensetzung der Nährlösung und deren Spaltungsprodukte ist und je rascher sie sich bei der Uebertragung aus einer günstig zusammengesetzten Nährlösung in eine weniger günstige den neuen Vegetationsbedingungen anpasst, desto mehr Zellen der Einsaat werden am Leben bleiben. Die den neuen Lebensverhältnissen angepaßten Zellen werden dann neben den Produkten der Autolyse der abgestorbenen Zellen auch den der

Nährlösung zugesetzten Ester ausnützen können, der vor der Anpassung der Zellen im Gegensatz zu den allmählich in einer Nährlösung entstehenden Estern kurze Zeit ein gewisses Hindernis für die Entwicklung bildet, wie bei früheren Versuchsreihen wiederholt betont wurde. Wenn in verschiedenen B. V.-Kolben eine bessere Vermehrung eintrat, als in den Parallelversuchen mit 0,06% Estergehalt, so kann dies vielleicht damit erklärt werden, daß in jenem Fall das allerdings geringe Hindernis, welches der zugesetzte Ester für kurze Zeit bildet, wegfällt und daß, wenn als hauptsächliche Kohlenstoffquelle der Luft beigemischter Esterdampf in Frage kommt, jener in ungemein starker Verdünnung und sehr allmählich, ähnlich wie in natürlichen Gärflüssigkeiten, einer grösseren Anzahl überlebender Zellen dargeboten wird.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß allerdings ein Zusatz selbst geringer Estermengen auf die zu den Versuchen verwendeten Arten entwicklungshemmend wirkt, daß die Hemmung der Entwicklung jedoch gering ist und nur kurze Zeit dauert und umso rascher überwunden wird, je rascher sich die Zellen den neuen Verhältnissen anpassen. Dann aber nützen sie den Ester als Kohlenstoffquelle in ausgiebigster Weise aus. Die Menge der neu entstehenden Hefezellen, welche in der Stärke der Absätze und der Hautbildung ihren Ausdruck fand, stand bis zu einer gewissen Grenze in direkter Beziehung zu den Mengen des der Nährlösung zugesetzten Esters.

Bezüglich der Widerstandsfähigkeit und des Anpassungsvermögens der verschiedenen Organismen ist der allgemeine Eindruck der, daß die zur Verwendung gekommenen Kulturhefen den Ester offenbar weniger ausnützen können, als die wilden Hefen und diese teilweise wieder hinter den hautbildenden Formen zurückstehen.

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Versuchsreihe mit denen der ersten, welche die Wirkung des Esters auf in gehopfte Bierwürze eingeimpfte Organismen überhaupt klarlegte, so ergibt sich neben den eben besprochenen, charakteristischen Unterschieden vielfach Uebereinstimmung.

Die beim ersten Versuch schon festgestellte verzögernde Wirkung des Aethylesters nach Maßgabe seiner Menge, wurde auch hier wieder be-

obachtet, doch konnte man eine der Verzögerung folgende beschleunigende Esterwirkung nur selten feststellen.

Weitere Uebereinstimmungen mit dem ersten Versuch bestanden darin, daß auch diesmal in fast allen Fällen die bekannte „optimale Estermenge“ wieder beobachtet und daß das Angehen der Organismen gegen die Grenze hin schwankend wurde. Ebenso nahmen die Absätze nach oben hin in der Stärke wieder ab, nachdem sie in den der optimalen Estermenge entsprechenden mittleren Konzentrationen ein gewisses Höchstmaß erreicht hatten.

Zum Schluß sei hier noch eine interessante, in der Einleitung bereits angedeutete Erscheinung mitgeteilt. In einigen Kolben kamen Schimmelinfektionen vor, die trotz des 0,5, teilweise auch 1 % betragenden Esterzusatzes neben den eingeimpften Organismen ganz vorzüglich gediehen. Beobachtet wurden solche Fälle bei der Steinberg 1892 und Stamm 93 in Kolben mit 1 % Estergehalt, ferner bei Mykoderma decolorans und Torula 3 in Proben mit je 0,5 % Estergehalt.

Es gibt also auch Schimmelarten, die ihren Kohlenstoffbedarf aus zugefügtem Ester entnehmen können, wenn keine andere Bezugsquelle zur Verfügung steht. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die verwendete mineralische Nährlösung für diese Organismen gute Vorbedingungen bietet, da sie eine für Schimmelpilze besonders gut geeignete Zusammensetzung aufweist.

Stamm 7 und Stamm 93.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	Noch keine sichtbare Vermehrung	—	—	—	—	—	Anfänge von Kolonien		—
nach 8 Tagen	Ganz wenig Kolonien	—	—	—	—	—	Wenig Kolonien		—
nach 12 Tagen	Kolonien etwas stärker geworden	—	—	Schwache Absätze mit zahlreichen Kolonien			Wenig Kolonien		
nach 20 Tagen	Geringe Hefeabsätze	—	wenig, aber ziemlich starke Kolonien	Mäßig starke Absätze mit zahlreichen Kolonien			Schwache Absätze mit schwachen Kolonien		—
nach 40 Tagen	Geringe Hefeabsätze	—	wenig, aber kräftige Kolonien	Keine Veränderung mehr festzustellen					—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Oberhefe 25 und Oberhefe 170.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06% *)
nach 4 Tagen		—	—		—			—	
nach 8 Tagen	Ganz geringe Absätze	—			—	—		—	
nach 12 Tagen	Geringe Absätze	—	—		Geringe Absätze mit Kolonien				Spuren von Absätzen
nach 20 Tagen	Geringe Absätze	—	Vereinzelte Kolonien	Geringe Absätze	Ueberall schwache Absätze sichtbar				Einzelne Kolonien
nach 40 Tagen	Geringe Absätze	—	Ganz geringe Absätze	Geringe Absätze	Schwache Absätze				Ganz geringe Absätze

*) Bei Oberhefe 170 erfolgte in der niedersten Konzentration kein Wachstum.

Sacch. pastorianus. Sacch. ellipsoideus und Wilde Hefe 811.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	Wenig schw. Kolonien	In allen Kulturen zahlreiche, schwache Kolonien sichtbar							Spur von Kolonien
nach 8 Tagen	Schwache Kolonien	Zahlreiche Kolonien sichtbar				Schwache Absätze			Wenig und schwache Kolonien
nach 12 Tagen	Schwache Absätze	Zahlreiche, ziemlich kräftige Kolonien	Zahlreiche kräftige Kolonien		Ziemlich starke Absätze				Schwache Kolonien
nach 20 Tagen	Schwache Absätze	Kräftige Kolonien	Zahlreiche, kräft. Kolonien Kein zusammenhängender Absatz		Ziemlich starke Absätze				Schwache Kolonien

Steinberg 1892 und Schloß Johannisberg.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	Schwache Absätze m. schw. Kolonien	—	—	—	Geringe Absätze	Mäßige Absätze mit ziemlich starken Kolonien		Schwache Absätze	Vereinzelte Kolonien
nach 8 Tagen	Mäßige Absätze	—	—	—	Schwache Absätze	Mäßige Absätze		Schwache Absätze	Geringe Absätze
nach 12 Tagen	Mäßige Absätze	—	—	Schwache Absätze	Mäßige Absätze	Bedeutende Absätze		Bedeutende Absätze	Schwache Absätze
nach 20 Tagen	Mäßige Absätze	—	—	Mäß. Absätze mit starken Kolonien	Bedeutende Absätze	Ziemlich starke Absätze			Schwache Absätze

Pichia membranaefaciens. Mykoderma decolorans. Mykoderma valida. Willia anomala Will. Willia anomala Hansen.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	—	—	—		Bei allen Proben sieht man vereinzelte, dünne matte Hautinselchen				
nach 8 Tagen	Ganz geringe Hautbildung	—	Eben beginn. Hautbildung	Oberfläche ¾ bed. v. dünner, glasiger Haut	Oberfläche überall lückenhaft bedeckt mit dünner, glasiger Haut				Mehrere größere Hautinselchen
nach 12 Tagen	Geringe Hautbildung	—	Vereinzelte dünne Hautinselchen	Oberfläche lückenhaft bedeckt von dünner, glasig-weißlicher Haut					Inselchen etwas stärker geworden
nach 20 Tagen	Geringe Hautbildung	Einige kleine Hautinselchen	Es hat sich überall ein weißer Bodensatz von abgesunkenen Hautteilchen gebildet, an der Oberfläche geringe Neubildungen						Ziemlich starke Hautbildung

Torula 2.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	Noch keine Vermehrung sichtbar	—	—		—	Sehr geringe Absätze sichtbar			
nach 8 Tagen	Sehr geringe Absätze sichtbar	—	—		Sehr geringe Absätze	Beginnende Hautbildung in kleinen Inselchen			Geringe Absätze
nach 12 Tagen	Sehr geringe Absätze	—	—	Schwache Hautinselchen		Die Hautbildung schreitet fort, überall Inselchen von weißer, dünner Haut			Geringe Hautbildung
nach 20 Tagen	Geringe Absätze Keine Haut	Hautinselchen über die ganze Fläche. Ziemlich starke Bodensätze		Haut mit Lücken über die ganze Oberfläche Mäßige Absätze		Ueberall größere, weißliche, dünne Hautinselchen. Mäßige Bodensätze			

Torula 3.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	Schwache Absätze Kleine Hautinselchen	—	—	—	Eben beginnende Hautbildung	Mäßige Absätze Eine größere Hautinsel		Geringe Absätze Spuren von Hautbildung	—
nach 8 Tagen	Mäßige Absätze. Geringe Zunahme der Inselchen	—	—	—	Schwache Absätze Minimale Hautbildung	Mäßige Absätze Geringe Zunahme der Hautbildung		Schwache Absätze Schwache Hautinseln	—
nach 12 Tagen	Mäßige Absätze. Kleine, dünne Hautinselchen	—	—	—	Starke u. zahlr Kolonien Wenig Hautbildung	Mäßige Absätze Schwache Hautbildung		Mäßige Absätze Geringe Hautbildung	—
nach 20 Tagen	Keine Veränderung mehr festzustellen	—	—	—	Ziemlich starke Absätze Wenig Hautbildung		Ziemlich starke Absätze Schwache Hautbildung		—

Torula 12 und Torula 15.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	-	—	—	-	-	Ganz minimale Hautinselchen sichtbar			—
nach 8 Tagen	Ganz geringe Neubild. in kl. Inselchen	—	—	Ganz schwache Inselchen		Verschiedentlich größere, weiße Inselchen			Vereinzelte, dünne Hautinselchen
nach 12 Tagen	Ganz schw. Hautinselchen	—	Minimale Hautbildung	Ziemlich starke Hautinselchen von weißer Farbe sichtbar					Schw. Hautinselchen
nach 20 Tagen	Schw. Hautinselchen	—	Sehr schwache Hautbild.	Ziemlich starke Inselchen					Schwache Hautbildung

Sachsia suaveolens.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 4 Tagen	Zieml. starkes Wachstum in weiß. Rasen	Geringes Wachstum in weißen Rasen		In allen Proben ziemlich starkes Wachstum in weißen Rasen					
nach 8 Tagen	Stark. Wachstum in u. auf d. Flüssigkeit	In allen Proben außerordentlich üppiges Wachstum in weißen Rasen in und auf der Flüssigkeit							
nach 12 Tagen	Rasen noch etwas stärker geworden	Die Stärke der Rasen hat in allen Fällen noch etwas zugenommen, der Einfluß des Esters machte sich zweifellos in günstiger Weise bemerkbar							

V. Einwirkung von Essigsäureamylester auf verschiedene Hefen und andere Sprosspilze in steriler, gehopfter Bierwürze.

1. Beobachtung der Einwirkung nach äusseren Erscheinungen.

Der Versuch mit Amylester ist der Parallelversuch zu dem im Kapitel III beschriebenen Aethylesterversuch. Demzufolge gelten alle dort gemachten Angaben über die Anstellung der Versuche und deren Kontrollierung, die Zusammensetzung der Nährlösung, die verwendeten Organismen u. s. w. ohne weiteres auch für hier.

Die Menge der Einsaat betrug wie immer eine Platinöse voll Absatz oder Haut. Die Kulturen waren frisch, ihr Alter betrug 2 Tage. Die Beobachtungsdauer war 16 Tage.

Die Löslichkeit des Amylesters in Würze ist minimal. Beim Schütteln bildet er mit der Würze eine Emulsion, nach längerem Stehen sammelt er sich über der Nährflüssigkeit in einer Schicht an. Dies gab zu der Vermutung Anlass, daß die luftliebenden, auf der Flüssigkeitsoberfläche vegetierenden Versuchsorganismen wahrscheinlich durch die Esterschicht in ihrem Wachstum stark behindert würden.

Im Folgenden seien die bei den einzelnen Versuchsorganismen beobachtenden Erscheinungen ausführlich mitgeteilt. Eine kurze Zusammenfassung der wesentlichsten Punkte, sowie die zugehörigen Tabellen befinden sich am Schluß des Abschnittes.

Stamm 7:

Die Hefe ging noch bei einem Esterzusatz von 1 % an. Wie beim Parallelversuch mit Aethylester konnte man auch hier deutlich eine Verzögerung beobachten, die der Menge des zugesetzten Esters direkt proportional war. Dagegen war es nach den äußerlichen Beobachtungen allein nicht möglich, eine auf die durch den Ester hervorgerufene Verzögerung folgende Beschleunigung festzustellen. Dies mag vor allem auch daran liegen, daß die Wachstumsgrenze tiefer als beim Aethylester lag.

Die Stärke der Absätze erschien äußerlich von dem Ester nicht beeinflußt. Am Ende des Versuchs waren alle gleich stark wie beim B. V.

Stamm 93:

Diese untergärige Bierhefe verhielt sich in allem genau wie Stamm 7.

Oberhefe 25:

Die Hefe ging wie die beiden Stammhefen bei einem Esterzusatz von 1 % noch an. Man bemerkte auch hier wieder die verzögernde Wirkung des Esters, vielleicht auch eine kleine darauffolgende Beschleunigung. Die Absätze erschienen beim Schluß des Versuchs alle gleich stark wie beim B. V.

Oberhefe 170:

Verhielt sich in allem wie Oberhefe 25.

Wilde Hefe 811:

Die Hefe ging noch bei 0,75 % Esterzusatz an. Die durch den Ester hervorgebrachte Verzögerung war deutlich zu erkennen. Die Absätze wiesen in der Stärke gegenüber dem B. V. kaum einen Unterschied auf.

Sacch. pastorianus:

Diese Art ging bei 0,75 %, manchmal auch bei 1 % Esterzusatz noch an. Bei ihr war die verzögernde Wirkung des Esters ziemlich bedeutend. Die Absätze waren in den Konzentrationen unter 1 % ziemlich gleich stark wie beim B. V. Bei 1 % erschienen sie etwas schwächer. Man kommt also auch hier wieder zu der schon beim Aethylesterversuch gemachten und durch Zählungen bestätigten Beobachtung, daß der Ester in größeren Mengen ungünstiger auf die Vermehrung der Organismen einwirkt, als in kleineren.

Sacch. ellipsoideus:

Diese Hefe ging noch bei 1 % Esterzusatz an. Ihr sonstiges Verhalten entsprach ganz dem des Sacch. pastorianus. Man sah auch hier wieder eine Abnahme der Absätze nach der Grenzkonzentration hin.

Steinberg 1892:

Diese Weinhefe ging bis zu einem Esterzusatz von 0,75 %, manchmal auch noch von 1 % an. Bei den beiden niedersten Konzentrationen schien der Ester eine direkt fördernde Wirkung auf die Vermehrung der Hefe auszuüben, da die Gärung der betreffenden Kolben bei gleicher Einsaatmenge der des B. V.

vorauseilte. Bei den höheren Konzentrationen sah man die gewöhnliche Verzögerung. Außerdem konnte man bei der Grenzkonzentration Abnahme des Absatzes konstatieren.

Schloß Johannisberg:

Auch hier war eine direkt fördernde Wirkung des Esters in den zwei niedersten Konzentrationen deutlich zu bemerken, da Beginn und Ende der Gärung dem B. V. voraus waren. Die Hefe ging mit mäßiger Verzögerung noch bei 0,75 % Esterzusatz an, ein Unterschied in der Stärke der Absätze konnte nicht festgestellt werden.

Mykoderma decolorans:

Dieser luftliebende Organismus gedieh noch bei einem Zusatz von 0,75 %, manchmal noch von 1 % Ester. Auch hier sah man neben geringer Förderung in den niedersten Konzentrationen die gewöhnlich beobachtete Verzögerung. Die Stärke der Hautbildung war bis zu einem Zusatz von 0,75 % Ester gleich wie beim B. V. In den Kulturen mit 1 % war sie entschieden schwächer. Die Farbe der Haut war in den mit Ester versetzten Kolben mehr gelblich als beim B. V. Die beim Aethylesterversuch seinerzeit beobachteten strangartigen Falten der Haut kamen unter der Einwirkung des Amylesters nirgends zu stande. Eine Förderung der Vermehrung, welche beim Aethylesterversuch in den strangartigen Falten in die Erscheinung trat, war also hier nicht zu beobachten. Bemerkenswert ist jedenfalls, daß trotz der auf der Oberfläche der Würze liegenden Esterschicht starke Hautbildung auftrat.

Willia anomala Hansen:

Die Willia ging nur in den beiden niedersten Konzentrationen an. Man beobachtete dabei eine durch den Ester hervorgerufene Förderung des Wachstums. Die in beiden Fällen gebildete Haut war normal entwickelt und gleich stark wie beim B. V., ihre Farbe erschien jedoch etwas mehr gelblich.

Torula 2:

In den niedersten Konzentrationen sah man deutlich eine durch den Ester hervorgerufene Beschleunigung des Wachstums. Größere Mengen von Ester machten wie immer eine verzögernde Wirkung geltend. Der Sproßpilz ging noch bei 0,75 %, manchmal noch bei 1 % Esterzusatz an. Absätze und Hautbildung waren in den niedersten Konzentrationen stärker als beim B. V., in den höheren Konzentrationen blieben sie hinter dem B. V. zurück.

Torula 3:

Auch hier war in den niedersten Konzentrationen eine geringe Förderung durch den Ester wahrnehmbar; mit größeren Estermengen hielt die wie gewöhnlich auftretende Verzögerung gleichen Schritt. Die Art ging bis zu einem Esterzusatz von 1% noch an. Die Stärke der Hautbildung erschien mit Ausnahme der höchsten Konzentration gleich wie beim B. V.

Apiculatus Form 1:

Der Sproßpilz ging noch bei einem Esterzusatz von 0,75% an. Bei dieser langsam wachsenden Art sah man die verzögernde Wirkung des Esters ziemlich deutlich, während eine darauffolgende Förderung oder Beschleunigung nicht beobachtet wurde. Die zum Schluß entstandenen Absätze waren gleich stark wie beim B. V.

Apiculatus Form 3:

Ging bis zu einem Esterzusatz von 0,75%, manchmal auch noch von 1% an. In der niedersten Konzentration war eine geringe fördernde Wirkung des Esters zu bemerken, im übrigen verhielt sie sich gleich wie Apiculatus Form 1.

Apiculatus Form 4:

Ging bis zu einem Zusatz von 0,75% Ester an und verhielt sich im übrigen gleich wie Form 1.

Apiculatus Form 7:

Verhielt sich gleich wie Form 1 und 4.

Am Schluß des Versuchs wurden sämtliche Proben einer mikroskopischen Untersuchung unterworfen. Die Zellen aller angegangenen Organismen waren lebend und in gutem Zustand und wiesen keine morphologischen Veränderungen auf.

Der Versuch mit Amylester ergab folgendes:

Der Ester wirkte in den niedersten Konzentrationen meist etwas fördernd auf das Wachstum der Organismen ein.

In den höheren Konzentrationen veranlaßte der Ester eine deutlich sichtbare, starke Verzögerung der Vermehrung und Gärung. Diese Verzögerung stand in direktem Abhängigkeitsverhältnis zu der zugesetzten Estermenge.

Nimmt man wie früher diejenige Estermenge, die den Versuchsorganismen ein Wachstum noch erlaubte, als Maßstab für deren Widerstandsfähigkeit gegen den Amylester, so erhält man folgende Reihe:

1%: Stamm 7. Stamm 93. Oberhefe 25. Oberhefe 170. Sacch. pastorianus. Sacch. ellipsoideus. Torula 3.

0,75% (1%): Steinberg 1892. Mykoderma decolorans. Torula 2. Apiculatus Form 3.

0,75%: Schloß Johannisberg. Wilde Hefe 811. Apiculatus Form 1, 4 und 7.

0,5%: Willia anomala Hansen.

Man sieht, daß in diesem Fall die Kulturhefen verhältnismäßig wenig empfindlich gegen Amylester sind, während sich die hautbildenden und wilden Hefen verschieden verhalten.

Alle oben besprochenen Erscheinungen stimmen mit den beim Aethylesterversuch beobachteten überein. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Versuchen besteht darin, daß die Organismen vom Amylester im höchsten Fall die Menge von 1% ertragen, während der Aethylester in weit größeren Mengen vertragen wird. Der Amylester wirkt also schon in geringerer Menge giftig auf die Organismen ein, als der Aethylester.

Trotz dieser größeren Giftigkeit kann man nicht annehmen, daß der Amylester ein Kampfmittel in Delbrück'schem Sinn ist, da die von den Organismen vertragenen Estermengen immerhin noch so bedeutend sind, daß sie bei natürlichen Gärungen niemals erreicht werden.

Auch ergab der Versuch keinen Beweis dafür, daß bei dem Konkurrenzkampf von Apiculatusarten mit Kulturhefen in geringen Mengen entstandener Amylester den letzteren schädlich werden könnte.

Interessant war, daß verschiedene Schimmelinfektionen in Kolben auftraten, die 0,5 und 1% Ester enthielten, und die Anwesenheit des Esters ohne Schaden ertrugen.

Stamm 7 und Stamm 93.

Zeit	B. V.	1%	0,75 bis 0,5%	0,06%
nach 2 Tagen	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	Geringe Hefevermehrung Schwache Trübung	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze
nach 3 Tagen	Gärung dem Ende zugehend Sehr starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Zieml. starke Trübung	Geringe Nachgärung Starke Trübung Dicke Absätze	
nach 4 Tagen	Gärung beendigt Klarwerden der Lösung Dicke Absätze	Gärung dem Ende zugehend Starke Trübung Starke Absätze	Gärung zu Ende Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	

Oberhefe 125 und Oberhefe 170.

B. V.	1%	0,75 bis 0,5%	0,06%
Lebhafte Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze	—	Schwache Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Mäßige Absätze
Geringe Nachgärung Starke Trübung Sehr starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Zieml. starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	Geringe Nachgärung Starke Trübung Sehr starke Absätze
Gärung beendigt Nachlassen d. Trübung Dicke Absätze	Geringe Nachgärung Starke Trübung Starke Absätze	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	

Sacch. pastorianus. Sacch. ellipsoideus. Wilde Hefe 811.

Zeit	B. V.	1%	0,75 bis 0,5%	0,06%
nach 2 Tagen	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	—	Mäßige Gärung Starke Trübung Sehr starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Sehr starke Absätze
nach 3 Tagen	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	Vereinzelte Kolonien	Lebhafte Gärung Starke Trübung Sehr starke Absätze	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze
nach 4 Tagen	—	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Sehr starke Absätze	—
nach 5 Tagen	—	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Starke Absätze	—	—

Steinberg 1892 und Schloß Johannisberg.

B. V.	1%	0,75 bis 0,5%	0,06%
Mäßige Gärung Starke Trübung Zieml. starke Absätze	Zahlreiche Kolonien	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	
Lebhafte Gärung Starke Trübung Sehr starke Absätze	Mäßige Gärung Starke Trübung Zieml. starke Absätze	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Dicke Absätze	
Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Sehr starke Absätze	Lebhafte Gärung Starke Trübung Starke Absätze	—	—
—	Gärung beendigt Nachlassen der Trübung Starke Absätze	—	—

Torula 2.

Zeit	B. V.	1%	0,75 bis 0,5%	0,06%
nach 2 Tagen	Schwache Absätze	—	—	Starke Absätze
nach 3 Tagen	Mäßige Absätze	—	Mäßige Absätze	Starke Absätze
nach 4 Tagen	Mäßige Absätze GeringeHautbildung	Vereinzelte Kolonien	Ziemlich starke Absätze	Starke Absätze Mäßige Hautbildung
nach 5 Tagen	Zieml. starke Absätze Sehr dünne Haut über die ganze Oberfläche	Zahlreiche, kräftige Kolonien	Ziemlich starke Absätze Sehr dünne Haut	Starke Absätze Schwache Haut

Torula 3 und Mykoderma decolorans.

B. V.	1%	0,75 bis 0,5%	0,06%
Beginnende Hautbildung	Beginnende Hautbildung	Oberfläche zum großen Teil bedeckt von dünner, glasig-weißer Haut	
Schwache, weißliche Haut über die ganze Fläche	Dünne, weiße Haut über die ganze Fläche ohne Falten	Mäßig starke, weiße Haut mit zahlr. Falten	Kräftige, weiße Haut mit zahlr. Falten
Kräftige, weißliche Haut mit Falten	Ziemlich kräftige, weiße Haut mit Falten	Kräftige, gelbliche Haut mit zahlreichen Falten	
—	—	—	—

Willia anomala Hansen.

Zeit	B. V.	1 bis 0,75%	0,5%	0,06%
nach 2 Tagen	Dünne, weiße Haut über die ganze Fläche	—	Weiße Haut über d. ganze Fläche Anfänge von Falten	Zieml. starke, gelbl. Haut mit Falten
nach 3 Tagen	Kräftige, weiße Haut mit Falten	—	Kräftige, gelbliche Haut mit zahlreichen Falten	
nach 5 Tagen	Kräftige, weiße Haut mit zahlreich. Falten	—	Kräftige, gelbliche Haut mit zahlreichen Falten	

Apiculatus Form 1, 3, 4 und 7.

B. V.	1%	0,75 bis 0,5%	0,06%
Starke Trübung Zieml. starke Absätze	Starke Trübung Zahlreiche Kolonien	Starke Trübung Zieml. starke Absätze	Starke Trübung Starke Absätze
Starke Trübung Starke Absätze	Starke Trübung Zieml. starke Absätze	Starke Trübung Starke Absätze	
Nachlassen der Trübung Sehr starke Absätze	Starke Trübung Starke Absätze	Nachlassen der Trübung Sehr starke Absätze	

2. Beobachtung der Einwirkung nach Zählungen.

Um auch für den Amylester ein übersichtliches Bild von seiner Einwirkung auf die in Würze befindlichen Organismen zu erhalten, wurden wie in Kapitel III einige Zählungen vorgenommen.

Die verwendeten Organismen waren dieselben wie dort, die Kulturen waren immer zwei Tage alt, frisch und kräftig. Angesetzt wurden die Konzentrationen 0,06; 0,5; 0,75 und 1%, sowie der zugehörige B. V.

Die nach den früheren Angaben vorgenommenen Zählungen ergaben folgende Resultate:

Stamm 7:

Der B. V. wurde anfangs von keiner der mit Ester versetzten Kulturen in der Zellenzahl erreicht. Erst nach 49 und 56 Stunden, also nach bedeutender Verzögerung, näherte sich die in der Zähleinheit befindliche Zellenzahl bei der niedersten Konzentration dem B. V., um diesen nach 63 Stunden zugleich mit der zweitniedersten Konzentration zu überflügeln. Die höheren Konzentrationen erlitten eine noch stärkere Verzögerung und blieben in der Vermehrung hinter dem B. V. zurück.

Der Ester wirkte also in allen Fällen stark verzögernd und übte erst nach ziemlich langer Zeit in den beiden niedersten Konzentrationen eine mäßig fördernde Wirkung auf die Vermehrung der Hefe aus. Die beiden niedersten Konzentrationen stellten also in diesem Fall die optimale Estermenge dar.

Stamm 93:

Bei dieser Hefe lagen die Verhältnisse gleich wie bei Stamm 7. Es fand auch hier nach ziemlich starker Verzögerung eine mäßige Förderung bei der niedersten, eine geringe bei der zweitniedersten Konzentration statt, die damit wieder die optimale Estermenge darstellten. Die höheren Konzentrationen blieben hinter dem B. V. zurück.

Oberhefe 25:

Auch hier stellten die beiden niedersten Konzentrationen die optimale Estermenge vor, da bei ihnen die Zellenzahl in der Zähleinheit nach allerdings bedeutender Verzögerung größer war, als beim B. V.

Die höheren Konzentrationen blieben stark hinter dem B. V. zurück.

Oberhefe 170:

Bei dieser Hefe übte der Ester nur in den niedersten Konzentrationen eine geringe fördernde Wirkung aus, während alle anderen Konzentrationen starke Verzögerung und Hemmung der Vermehrung aufwiesen.

Wilde Hefe 811:

Wie bei der eben besprochenen Art wirkte der Ester auch hier nur in den niedersten Konzentrationen in geringem Maße fördernd. Die andern Konzentrationen blieben in der Stärke der Vermehrung hinter dem B. V. zurück.

Apiculatus Form 3:

Der Ester wirkte wieder nur in der niedersten Konzentration in geringem Maße fördernd, während alle andern Konzentrationen starke Hemmungen in ihrem Wachstum erlitten.

Die Ergebnisse der Zählungen führen zu folgenden Schlußfolgerungen:

Die Zählungen haben die aus den Beobachtungen der äußeren Erscheinungen gezogenen Schlüsse bestätigt.

Eine direkte Förderung findet bei Zusatz von Amylester überhaupt kaum statt. Es dauert ziemlich lange, bis die Zellen sich an den Ester gewöhnen. Wenn schon eine Förderung der Vermehrung durch den Ester eintritt, dann ist dieselbe immer nur gering und beschränkt sich auf die niedersten Konzentrationen.

Trotzdem sind die von den Organismen ertragenen Amylestermengen noch zu groß, als daß man annehmen könnte, daß bei natürlichen Gärungen etwa entstandener Amylester allein imstande wäre, tötlich auf Hefen ähnlicher Art, wie die verwendeten, einzuwirken.

Stamm 7. Zähleinheit: 0,046 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	0,75%	1%
nach 24 Std.	4,50	2,91	—	—	—
31 Std.	7,90	4,98	0,31	—	—
49 Std.	17,69	16,01	11,21	1,01	
56 Std.	23,02	23,98	22,99	6,76	1,27
63 Std.	28,72	30,76	30,02	18,08	13,21
79 Std.	28,96	31,02	30,90	23,52	20,16
97 Std.	—	—	—	24,03	21, 01

Stamm 93. Zähleinheit: 0,033 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	0,75%	1%
nach 24 Std.	5,4	3,9	—	—	—
31 Std.	8,7	5,31	0,26	—	—
49 Std.	21,61	18,81	14,30	0,12	—
56 Std.	24,31	27,39	25,08	6,54	5,44
63 Std.	30,45	33,39	30,89	19,98	15,46
79 Std.	30,99	39,90	31,72	27,30	20,71
97 Std.	—	—	—	27,95	23,31

Oberhefe 25. Zähleinheit: 0,0263 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	0,75%	1%
nach 24 Std.	3,62	2,31	1,70	—	—
31 Std.	8,56	5,32	4,01	-	—
49 Std.	16,21	15,78	14,36	1,21	—
56 Std.	19,21	20,25	19,37	6,50	4,3
63 Std.	27,91	34,06	31,72	17,10	13,12
79 Std.	28,56	36,72	32,76	23,80	19,60
97 Std.	—	—	—	25,83	21,71

Oberhefe 170. Zähleinheit: 0,024 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	0,75%	1%
nach 24 Std.	0,76	—	—	—	—
31 Std.	1,06	0,59	—	—	—
49 Std.	4,95	7,15	0,24	—	—
56 Std.	9,66	9,45	3,44	2,10	1,98
63 Std.	17,68	19,58	8,76	8,46	7,39
79 Std.	21,23	23,45	18,76	16,43	15,75
97 Std.	22,12	24,24	19,23	18,42	16,56

Wilde Hefe 811. Zähleinheit: 0,0197 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	0,75%	1%
nach 24 Std.	2,94	0,53	—	—	—
31 Std.	4,68	2,93	0,12	—	—
49 Std.	16,78	15,61	3,14	0,99	—
56 Std.	26,53	27,37	12,64	2,11	—
63 Std.	27,93	30,68	25,98	14,68	—
79 Std.	28,02	31,54	27,43	21,17	—
97 Std.	—	—	27,65	22,12	—

Apiculatus Form 3. Zähleinheit: 0,0186 Zellen

Zeit	B. V.	0,06%	0,5%	0,75%	1%
nach 24 Std.	0,13	—		-	—
31 Std.	1,17	0,17	—	—	—
49 Std.	3,68	1,98	1,02	1,07	0,79
56 Std.	12,59	10,12	5,45	2,12	1,06
63 Std.	15,17	18,96	14,17	12,43	10,02
79 Std.	26,18	29,17	26,01	20,16	17,93
97 Std.	27,01	30,54	26,71	22,13	20,34

VI. Essigsäureamylester als Kohlenstoffquelle für verschiedene Hefen und andere Sproßpilze in rein mineralischer Nährlösung.

Die hier zur Besprechung kommenden Versuche sind in vollständig gleicher Weise angesetzt, wie die in Kapitel IV besprochenen. Der einzige Unterschied gegenüber der eben benannten Versuchsreihe besteht darin, daß der Nährlösung statt des Aethylesters Amylester zugesetzt wurde. Bezüglich der Anstellung der Versuche und deren Kontrollierung, der Zusammensetzung der Nährlösung usw. gelten alle in der Einleitung zu Kapitel IV gebrachten ausführlichen Angaben. Zur Untersuchung gelangten in beiden Fällen die gleichen Organismen.

Die Menge der Einsaat betrug wie stets je eine Platinöse voll Absatz oder Haut. Die Kulturen waren kräftig, ihr Alter betrug drei Tage, die Beobachtungszeit vierzig Tage.

Der Amylester löst sich, wie schon früher bemerkt, in der Nährlösung nicht, sondern bildet eine über der Nährlösung stehende Schicht. Da er leichter ist als Wasser, stieg er auch in der Abfüllbürette rasch nach oben. Diesem Uebelstand konnte auch durch häufiges Schütteln nicht abgeholfen werden, so daß die den Estergehalt in Prozenten ausdrückenden Zahlen nicht mathematisch genau zutreffen. Da aber der Versuchsfehler für alle Kolben in gleicher Weise zutraf und das Verhältnis der Zahlen untereinander infolgedessen dasselbe blieb, wurde diese Fehlerquelle nicht weiter in Rechnung gezogen. Doch war von vornherein zu vermuten, daß die luftliebenden, normal an der Oberfläche der Nährlösung wachsenden Versuchsorganismen durch die auf der Nährflüssigkeit befindliche Esterschicht in ihrem Wachstum behindert würden.

Im Folgenden seien die bei den einzelnen Organismen beobachteten Erscheinungen ausführlich mitgeteilt. Eine kurze Zusammenfassung der wesentlichsten Punkte, sowie die zugehörigen Tabellen befinden sich am Schluß des Kapitels.

Stamm 7:

Die Hefe vermehrte sich in den mit Dextrose versetzten Vergleichskulturen langsam, erreichte aber darin ziemlich starke Absätze. In dem kohlenstofflosen B. V. kam sie ebenfalls fort, erzielte aber darin nur ganz schwache Absätze. In den mit

Ester versetzten Kolben ging sie noch mit einem Zusatz von 0,5 % an, die nächsthöhere Konzentration mit 1 % Estergehalt ließ keine Vermehrung mehr aufkommen. Das Wachstum war in allen Fällen kümmerlich. Die Absätze mit 0,06 % Estergehalt blieben in der Stärke hinter dem B. V. zurück, bei 0,25% waren sie gleich, bei 0,5% Estergehalt stärker als der B. V. Die höchste Konzentration stellte also zugleich die optimale Estermenge dar.

Bei der mikroskopischen Untersuchung am Schluß des Versuchs, also nach vierzig Tagen, sah man neben vielen toten auch lebende Zellen von normaler Beschaffenheit.

Stamm 93:

Das Verhalten dieser Hefe entsprach im allgemeinen dem bei Stamm 7 beobachteten.

Die mikroskopische Untersuchung ergab vielfach tote, daneben lebende, normale Zellen.

Oberhefe 25:

In den mit Dextrose versetzten Kolben entstand ziemlich starkes Wachstum, beim B. V. nur geringes. Die Hefe ging bis zu 0,5 % Esterzusatz an, die in den mit Ester versetzten Kolben entstandenen Absätze waren stärker als beim B. V., jedoch war das Wachstum allgemein sehr kümmerlich.

Unter dem Mikroskop sah man am Schluß des Versuchs meist tote Zellen, die noch lebenden hatten normales Aussehen.

Oberhefe 170:

Diese Oberhefe verhielt sich wie die soeben besprochene. Die Vermehrung war vielleicht noch kümmerlicher, als dort.

Sacch. pastorianus:

In den mit Dextrose versetzten Kolben trat kräftiges Wachstum ein, der B. V. erzielte nur schwache Absätze. Ein Angehen erfolgte noch mit 0,5 % Ester. Stärker als die Absätze des B. V. waren nur die mit 0,25 % Esterzusatz entstandenen.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte sehr gut erhaltene Zellen und vielfach Sporenbildung. Die Sporenbildung weist darauf hin, daß für die vegetative Vermehrung der Zellen ungünstige Bedingungen vorlagen. Die Hefe suchte sich durch die Sporenbildung zu schützen, ähnlich wie in andern Fällen Dauerzellbildung auftritt.

Sacch. ellipsoideus:

Verhielt sich in allem gleich wie Sacch. pastorianus.

Wilde Hefe 811:

Diese Hefe erreichte in den Dextrosekulturen starke Absätze, in dem B. V. nur geringe. Sie ging überraschenderweise, allerdings mit sehr starker Verzögerung, bei einem Zusatz von 4% Ester noch an. Die Vermehrung blieb jedoch in den Kolben mit 1 bis 4% weit hinter dem B. V. zurück, während sie in den niederen Konzentrationen stärkere Absätze aufwies. Die optimale Estermenge lag also bei den niederen Konzentrationen.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte in allen Fällen auffallend gut erhaltene Zellen.

Schloß Johannisberg:

Zeigte mit Dextrose starke, beim B. V. nur sehr schwache Absätze. Die Hefe ging mit Verzögerung bis zu 1% Esterzusatz an, alle Absätze waren stärker als die des B. V. Die beste Entwicklung zeigten die Kulturen mit 0,5% Ester.

Bei der mikroskopischen Untersuchung fand man sehr gut erhaltene Zellen und vielfach Sporenbildung.

Steinberg 1892:

Diese Weinhefe gedieh mit Dextrose sehr gut, brachte es aber beim B. V. nur zu sehr schwachen Absätzen. Sie ging mit mäßiger Verzögerung bis 1%, selten bis 2% Esterzusatz an und verhielt sich im übrigen wie Schloß Johannisberg.

Die mikroskopische Prüfung zeigte die Zellen in sehr gutem Zustand. Vielfach Sporenbildung.

Mykoderma valida:

Diese hautbildende Form gedieh mit Dextrose sehr üppig, beim B. V. entstanden nur schwache Hautinseln. Sie kam mit bedeutender Verzögerung noch bei 5% Esterzusatz fort, das Wachstum war aber äußerst gering und entsprach in den Konzentrationen von 1 bis 5% dem B. V., während in den Konzentrationen unter 1% der B. V. übertroffen wurde. Die optimale Estermenge lag also bei den niedersten Konzentrationen. Bemerkenswert ist, daß überhaupt Hautbildung auftrat trotz der starken auf der Oberfläche der Nährlösung liegenden Esterschicht.

Bei der mikroskopischen Prüfung zeigten die Zellen kümmerliches Anssehen, viele waren tot.

Mykoderma decolorans:

In den Dextrosekulturen kam üppiges, in den B. V.-Proben nur schwaches Wachstum zu stande. Ein Wachstum erfolgte bei starker Verzögerung noch mit 2% Esterzusatz. Die Haut-

bildung war in allen mit Ester versetzten Kolben weniger ausgeprägt, als die Absatzbildung. Das Wachstum war überall stärker als beim B. V., die optimale Estermenge lag bei den niedersten Konzentrationen. In diesem Falle war also die Hautbildung beeinträchtigt. Wenn Mykoderma decolorans sich stärker innerhalb der Nährlösung in Form von Absätzen entwickelte, so entspricht dies der Erfahrung, daß Mykoderma-Arten auch bei ziemlich weitgehender Luftentziehung noch zu wachsen vermögen.

Die mikroskopische Prüfung zeigte meist tote Zellen, die lebenden waren von kümmerlichem Aussehen.

Willia anomala Hansen:

Mit Dextrose entstand gutes, im B. V. nur kümmerliches Wachstum. Ein Wachstum erfolgte noch bei 2 % Esterzusatz. Die Hautbildung war auch hier weniger ausgeprägt, als die Absatzbildung.

Die mikroskopische Prüfung ergab gut erhaltene Zellen.

Willia anomala var. II Steuber:

Diese Art zeigte in den mit Dextrose versetzten Kolben sehr starkes, in den B. V.-Proben schwaches Wachstum. Sie ging bis 5 % Esterzusatz noch an, allerdings sehr kümmerlich und mit starker Verzögerung. Man konnte auch hier wieder die Beobachtung machen, daß die in den höheren Konzentrationen entstandenen Hautbildungen sich in der Stärke nicht von einander unterschieden. Die optimale Estermenge lag bei 0,25 %, die niederste Konzentration übertraf den B. V. nur wenig.

Bei der mikroskopischen Prüfung sah man gut erhaltene Zellen.

Pichia membranaefaciens:

Mit Dextrose zeigte diese Art hervorragendes Wachstum, in den B. V.-Kulturen nur schwaches. Ein Angehen erfolgte stark verspätet und höchst kümmerlich bis zu 3 % Esterzusatz. Die optimale Estermenge lag bei den zwei niedersten Konzentrationen, die als einzige den B. V. übertrafen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung fanden sich neben viel toten auch lebende Zellen, die aber ziemlich kümmerlich aussahen.

Torula 12:

Mit Dextrose entstand gutes, im B. V. schwaches Wachstum. Der Sproßpilz ging mit ziemlicher Verzögerung bis zu 3 % Esterzusatz an, das Wachstum war in den höheren Kon-

zentrationen aber sehr kümmerlich und blieb hinter dem B. V. zurück. Stärkeres Wachstum wiesen nur die zwei niedersten Konzentrationen auf, die damit die optimale Estermenge darstellten.

Die mikroskopische Untersuchung ergab fast nur tote Zellen, die überlebenden sahen kümmerlich aus.

Torula 15:

In den Dextrosekolben entstand eine kräftige Haut, während das Wachstum im B. V. nur schwach war. Ein Angehen fand mit mäßiger Verzögerung bei 1 % Esterzusatz noch statt, die Wachstumserscheinungen waren in den mit Ester versetzten Kulturen besser als beim B. V.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte neben zahlreichen toten auch lebende, normale Zellen.

Torula 2:

In den Dextrosekulturen ging ein sehr kräftiges Wachstum vor sich, beim B. V. war dasselbe nur minimal. Diese Torula ging mit der auch früher beobachteten Verzögerung bis zu 2 % Esterzusatz an, das Wachstum war überall sehr kümmerlich, übertraf jedoch den B. V.

Bei der mikroskopischen Untersuchung fand man meist tote Zellen.

Torula 3:

Mit Dextrose zeigte diese Art ziemlich kräftiges, in den B. V.-Kulturen schwaches Wachstum. Sie ging mit starker Verzögerung bis zu 2 % Esterzusatz an. Alle mit Ester versetzten Proben zeigten besseres Wachstum als der B. V. Die Entwicklung erfolgte bei dieser luftliebenden Art auf dieselbe Weise, wie bei Mykoderma decolorans, nämlich vorwiegend in Absätzen. Hautbildung war zwar vorhanden, aber stets nur sehr schwach.

Die mikroskopische Prüfung ergab neben viel toten auch lebende Zellen von guter Beschaffenheit.

Sachsia suaveolens:

Der Weinbukettschimmel gedieh mit Dextrose hervorragend und erreichte auch in dem B. V. mäßiges Wachstum in „Rasen". Der Pilz ging mit geringer Verzögerung bis zu 3 % Esterzusatz an, das Wachstum war in allen Fällen stärker als beim B. V., am besten bei den niedersten Konzentrationen.

Die mikroskopische Prüfung ergab in morphologischer Hinsicht nichts Besonderes.

Apiculatus Form 3:

Zeigte nur in den 0,06 % Ester enthaltenden Kolben geringe Vermehrung in kümmerlichen Zellen.

Apiculatus Form 4:

Zeigte nirgends Wachstum.

Nimmt man wie früher diejenigen Estermengen, bei welchen die einzelnen Versuchsorganismen noch angingen, als Maßstab für deren Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Ester, so ergibt sich folgende Reihe:

5 %: Mykoderma valida. Willia anomala var. II Steuber.

4 %: Wilde Hefe 811.

3 %: Torula 12. Pichia membranaefaciens. Sachsia suaveolens.

2 %: Torula 2. Torula 3. Mykoderma decolorans. Willia anomala Hansen.

1 %(2): Steinberg 1892.

1 %: Schloß Johannisberg. Torula 15.

0,5 %: Stamm 7. Stamm 93. Oberhefe 25. Oberhefe 170. Sacch. ellipsoideus. Sacch. pastorianus.

0,06 %: Apiculatus Form 3.

Nicht angegangen: Apiculatus Form 4.

Die hautbildenden Formen scheinen also am wenigsten durch den Esterzusatz in der Entwicklung behindert zu werden und können offenbar den Ester als Kohlenstoffquelle noch am besten ausnützen, eine Beobachtung, die auch bei dem entsprechenden Versuch mit Aethylester gemacht wurde. Die Kulturhefen dagegen sind durchweg weit empfindlicher, die Wilden Hefen zeigen verschiedene Widerstandsfähigkeit, im allgemeinen aber eine größere als die Kulturhefen.

Die Versuche mit Aethylester und Amylester sind direkt nicht miteinander zu vergleichen, insofern als der Aethylester sich in weitgehendem Maße in der Nährflüssigkeit löst, während der Amylester nach dem Schütteln auf der Flüssigkeit eine Schicht bildet und dadurch den Luftzutritt behindert. Die Menge des in der Nährflüssigkeit gelösten Amyelesters ist jedenfalls minimal. Auffällig ist es, daß einzelne der haut-

bildenden Versuchsorganismen direkt auf der Esterschicht ein, wenn auch geringes Wachstum bis zu 5 % Esterzusatz aufwiesen, während doch bei dem Amylesterversuch, der mit in Würze eingeimpften Organismen vorgenommen wurde, die Wachstumsgrenze schon bei 1 % Esterzusatz lag.

Gleichwohl decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Versuchsreihe in verschiedener Hinsicht mit den Resultaten jener Versuchsreihe, bei der Aethylester als Kohlenstoffquelle zugesetzt war. Der Amylester rief ebenfalls eine den zugesetzten Mengen direkt proportionale Verzögerung hervor. Diese Verzögerung konnte aber hier im allgemeinen schwerer beobachtet werden, da die Organismen vielfach nur in wenigen Konzentrationen angingen.

Aus dem gleichen Grunde wurde auch die Feststellung der optimalen Estermenge, die in den meisten Fällen zweifellos vorhanden war, erschwert. Wo sie aber deutlich hervortrat, lag sie meist bei den niedersten, seltener bei den mittleren Konzentrationen, wie dies im allgemeinen den beim Parallelversuch mit Aethylester gemachten Beobachtungen entsprach.

Die Vermehrung geschah auch in diesem Fall sehr langsam. Wie früher traten des öfteren die gleichen Erscheinungen (wie Sporenbildung) auf, die bei Hefen beobachtet werden, die sich ungünstigen Bedingungen anzupassen versuchen. Dies dürfte — wie bei dem Parallelversuch mit Aethylester auseinandergesetzt ist — in der wenig günstigen Zusammensetzung der Nährflüssigkeit und dem dadurch den Zellen auferlegten Zwang, sich erst anpassen zu müssen, begründet sein. Die Befürchtung, daß die Hautbildung der luftliebenden Organismen durch die Amylesterschicht auf der Oberfläche der Nährlösung völlig unterdrückt würde, hat sich also nicht bestätigt.

Sämtliche Organismen kamen auch in der rein mineralischen Nährlösung wieder fort. Die dabei beobachteten Erscheinungen stimmten mit den in Kapitel IV aufgezeichneten überein. Die ausführlichen Erklärungsversuche für diesen merkwürdigen Vorgang, die sich dort befinden, gelten also auch für hier.

Neben dem Gemeinsamen, das die beiden Versuchsreihen mit Aethyl- und Amylester darbieten, ergeben sich jedoch auch einige kleinere Unterschiede. Zunächst sei er-

wähnt, daß beim Amylesterversuch alle Organismen, die überhaupt angingen, auch bei der niedersten Konzentration mit 0,06 % Esterzusatz zur Entwicklung gelangten. Der kohlenstoffreicher zusammengesetzte Amylester konnte offenbar den Organismen auch in der niedersten Konzentration genug Kohlenstoff bieten, um ein, wenn auch sehr kümmerliches Wachstum zu ermöglichen.

Nach allen Beobachtungen scheint der Amylester giftiger für die Versuchsorganismen zu sein, als der Aethylester. Diese Schlußfolgerung ergibt sich daraus, daß im allgemeinen die Mengen Ester, welche noch eine Entwicklung zuließen, geringer waren, als beim Aethylester. Außerdem scheint der Amylester bezw. der als Spaltungsprodukt auftretende Amylalkohol von den Versuchsorganismen weniger ausgenützt werden zu können, da der durch den Ester anfangs hervorgerufenen Verzögerung eine Beschleunigung der Vermehrung in keinem Falle folgt.

Auf die geringe Ausnützbarkeit des Amylesters dürfte die Erscheinung zurückzuführen sein, daß verschiedene hautbildende Organismen zwar mit hohen Konzentrationen noch angingen, aber in den 3 oder 4 höchsten Konzentrationen nur sehr geringes und äußerlich gleich erscheinendes Wachstum zeigten. Die Stärke der Vermehrung schien also die gleiche zu sein, trotz der bedeutenden Unterschiede in den zugesetzten Estermengen.

Offenbar sind die Verhältnisse beim Amylester infolge seiner geringen Löslichkeit komplizierter, als beim Aethylester.

Zusammenfassend kann man jedoch auch in diesem Fall sagen, daß der Ester zwar zunächst auf die verwendeten Organismen auch in geringen Mengen entwicklungshemmend wirkt. Die Hemmung dauert jedoch nur kurze Zeit, die Zellen passen sich bis zu einer gewissen Grenze an und nutzen dann auch diesen Ester als Kohlenstoffquelle aus, allerdings nicht in dem Maße wie den Aethylester.

Trotzdem aus dem Versuch zu schließen ist, daß der Amylester im allgemeinen giftiger für die verwendeten Organismen ist, als der Aethylester, kann er doch nicht als ein Kampf-

mittel in Delbrück'schem Sinn betrachtet werden. Die Estermengen, welche von den verschiedenen Organismen vertragen werden, sind immerhin so bedeutend, daß deren Menge bei den natürlichen Gärungen niemals erreicht wird.

Die, soweit bekannt, bei natürlichen Gärungen entstehenden minimalen Mengen von Amylester können also allein niemals tötlich, höchstens äußerst schwach hemmend auf manche Organismen, wie die Kulturhefen, einwirken. Wilde Hefen, die bei natürlichen Gärungen im Kampf mit Apiculatus- und andern esterbildenden Sproßpilzarten in erster Linie in Frage kommen, sind dagegen im allgemeinen widerstandsfähiger.

Da von den zum Versuch verwendeten Apiculatusarten die eine Form überhaupt keinen Zusatz von Amylester, die andere nur einen solchen von 0,06 % vertrug, kann kaum angenommen werden, daß Apiculatusarten bei einem etwaigen Konkurrenzkampf gerade diesen Ester als Kampfmittel erzeugen werden.

Zum Schluss sei noch mitgeteilt, daß auch bei diesen Versuchen des öfteren Schimmelpilzinfektionen in Kolben mit 0,06; 0,5 und 1 % Estergehalt beobachtet wurden. Sie gediehen neben den eingeimpften Organismen; der Amylester schien auf sie keine schädliche Wirkung auszuüben.

Stamm 7 und Stamm 93.

Zeit	B. V.	0,5%	0,25%	0,06%
nach 8 Tagen	Vereinzelte Kolonien	Vereinzelte Kolonien	—	—
nach 20 Tagen	Sehr schwache Absätze	Vereinzelte aber ziemlich kräftige Kolonien	Aeußerst schwache Absätze mit Kolonien	
nach 30 Tagen	Schwache Absätze	Absätze sind nun mehr zusammenhängend, aber schwach	Schwache Absätze	Sehr schwache Absätze
nach 40 Tagen	Schwache Absätze	Mäßige Absätze	Schwache Absätze	Sehr schwache Absätze

Oberhefe 25 und Oberhefe 170.

B. V.	0,5%	0,25%	0,06 %
Spur von Absätzen	—	Spuren von Kolonien	—
Geringe Absätze mit Kolonien		Zahlreiche Kolonien	—
Geringe Absätze	Geringe Absätze	Mäßige Absätze	Geringe Absätze
Geringe Absätze	Schwache Absätze	Mäßige Absätze	Schwache Absätze

Sacch. pastorianus und Sacch. ellipsoideus.

Zeit	B. V.	0,5%	0,25%	0,06 %
nach 8 Tagen	Wenige sehr schwache Kolonien	Schwache Kolonien		Schwache Kolonien
nach 20 Tagen	Schwache Kolonien	Zahlreiche, aber sehr schwache Kolonien	Geringe Absätze mit zahlreichen Kolonien	Zahlreiche Kolonien
nach 30 Tagen	Schwache Kolonien	Schwache Kolonien	Schwache Absätze	Zahlreiche, ziemlich starke Kolonien
nach 40 Tagen	Schwache Absätze	Sehr schwache Absätze	Mäßige Absätze	Ziemlich schwache Absätze

Schloss Johannisberg u. Steinberg 1892.

B. V.	1%	0,5 %	0,25—0,06 %
Ganz geringe Absätze	—	Vereinzelte, schwache Kolonien	—
Geringe Absätze	Schwache Absätze	Wenige ziemlich kräftige Kolonien	Schwache Absätze
Geringe Absätze	Mäßige Absätze	Schwache Absätze	
Geringe Absätze	Mäßige Absätze	Mäßige Absätze	

Wilde Hefe 811.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2%	1%	0,5—0,25%	0,06%
nach 8 Tagen	Wenige sehr schwache Kolonien		—	—	—	—	Wenige schwache Kolonien	Vereinzelte Kolonien
nach 20 Tagen	Wenige schwache Kolonien	-	--	—		Spuren von Absätzen	Zahlreiche mäßig starke Kolonien	Wenige aber ziemlich kräftige Kolonien
nach 30 Tagen	Schwache Absätze mit kräftigen Kolonien	-	Ganz geringe Vermehrung			Geringe Absätze	Mäßige Absätze	Schwache Absätze
nach 40 Tagen	Schwache Absätze	—	Ganz geringe Absätze			Geringe Absätze	Mäßige Absätze	Mäßige Absätze

Mykoderma decolorans. Willia anomala Hansen. Torula 3.

Zeit	B. V.	5—4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06 %
nach 8 Tagen	—	—	—	—	—	Schwache Hautbildung		Schwache Hautbildung
nach 20 Tagen	Spuren von Hautbildung	—	—	—	Geringe Hautbildung	Schwache Hautbildung	Mäßige Hautbildung in größeren Inselchen	
nach 30 Tagen	Ganz geringe Hautbildung	—	—	Schwache Absätze Spur von Hautbildung	Schwache Absätze Geringe Hautbildung	Schwache Absätze Schwache Hautbildung	Mäßige Absätze Mäßige Hautbildung	
nach 40 Tagen	Geringe Absätze Geringe Hautbildung	—	—	Schwache Absätze Schwache Hautbildung		Ziemlich starke Absätze u. mäßig starke, dünne Haut		

Mykoderma valida und Willia anomala var. II Steuber.

Zeit	B. V.	5%	4%	3%	2—1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 8 Tagen		—	—	—	—	Sehr geringe Hautbildung	Schwache Hautbildung	
nach 20 Tagen	Spuren von Hautbildung	Ueberall Spuren von Absätzen sichtbar				Geringe Hautbildung Spuren von Absätzen	Schwache Hautbildung Schwache Absätze	
nach 30 Tagen	Geringe Hautbildung Spuren von Absätzen	Ganz geringe Hautbildung	In allen Kulturen geringe Hautbildung			Schwache Hautbildung Schwache Absätze	Schwache Hautbildung Mäßige Absätze	
nach 40 Tagen	Geringe Hautbildung Spuren von Absätzen	Ueberall ganz geringe Hautbildung und Spuren von Absätzen				Schwache Hautbildung Mäßige Absätze		

Pichia membranaefaciens und Torula 12.

Zeit	B. V.	5—4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06 %
nach 8 Tagen	—	—	—	—	—	Geringe Hautbildung		Schwache Hautbildung
nach 20 Tagen	Ganz geringe Hautbildung	—	In allen Kulturen geringe Hautbildung und geringe Absätze sichtbar			Schwache Hautbildung Geringe Absätze	Schwache Hautbildung Schwache Absätze	
nach 30 Tagen	Geringe Hautbildung	—	Ueberall geringe Hautbildung und geringe Absätze			Schwache Hautbildung Schwache Absätze	Schwache Hautbildung Mäßige Absätze	
nach 40 Tagen	Geringe Hautbildung Geringe Absätze	—	Nirgends mehr Veränderungen in der Stärke der Haut oder der Absätze sichtbar					

Torula 2.

Zeit	B. V.	2—1%	0,5%	0,5—0,06%
nach 8 Tagen	Spuren von Absätzen	—	Spuren von Absätzen	Geringe Absätze
nach 20 Tagen	Ganz geringe Absätze	Spuren von Absätzen	Ganz geringe Absätze	Spuren von Haut Schwache Absätze
nach 30 Tagen	Geringe Absätze	Eine größere Hautinsel u. schwache Absätze	Spur von Hautbildung Geringe Absätze	Geringe Hautbildung Mäßige Absätze
nach 40 Tagen	Geringe Absätze	Minimale Hautbildung Schwache Absätze	Geringe Hautbildung Mäßige Absätze	Geringe Hautbildung Mäßige Absätze

Torula 15.

B. V.	1%	0,5—0,25%	0,06%
Vereinzelte, sehr schwache Haut-inselchen	—	Schwache Hautbildung Schwache Absätze	Schwache Hautbildung Schwache Absätze
Schwache Haut-inselchen	—	Schwache Hautbildung Schwache Absätze	
Schwache Haut-inselchen	Ganz geringe Absätze	Schwache Hautbildung Mäßige Absätze	
Schwache Haut-inselchen Spuren von Absätzen	Geringe Absätze	—	—

Sachsia suaveolens.

Zeit	B. V.	5—4%	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,06%
nach 8 Tagen	Geringes Wachstum in Rasen	—	Geringes Wachstum	Geringes Wachstum	In allen Kulturen schwaches Wachstum			
nach 20 Tagen	Schwaches Wachstum	—	Schwaches Wachstum		In allen Kulturen ziemlich kräftiges Wachstum			
nach 30 Tagen	Mäßiges Wachstum in weißen Rasen		Mäßiges Wachstum		Kräftiges Wachstum		Kräftiges Wachstum	
nach 40 Tagen	Mäßiges Wachstum	—	Ziemlich kräftiges Wachstum		—	—	—	—

VII. Assimilierung der Ester.

1. Aethylester.

Nachdem die vorhergehenden Versuche einwandfrei ergeben hatten, daß die beiden verwendeten Ester von den verschiedensten Organismen zur Unterhaltung ihres Lebens- und Wachstumsprozesses ausgenützt und assimiliert werden, schien es interessant, der Frage nachzugehen, in welcher Weise die Organismen die Ester abbauen, um sie zum Aufbau ihrer Körpersubstanz zu verwenden.

Die Ester sind bekanntlich Kondensationsprodukte von Alkoholen und Säuren, bei einer Esterspaltung werden also voraussichtlich zunächst wieder Alkohole und Säuren entstehen.

Die bereits vorliegenden und in der Einleitung ausführlich gewürdigten Versuche von Hayduck und anderen, nach denen verschiedene organische Säuren von Sproßpilzen als Nahrung verwendet werden können, veranlaßten uns, unser Hauptaugenmerk auf die bei der Spaltung der Ester entstehenden organischen Säuren zu richten und deren qualitative und quantitative Bestimmung zu versuchen. Dabei blieb unberücksichtigt, daß sehr wahrscheinlich die bei der Titration gefundene Gesamtsäuremenge sowohl auf das eine Spaltungsprodukt, die Säure, als auch auf das andere, den Alkohol, zurückzuführen ist. Der Alkohol scheint nämlich nicht direkt, sondern erst nach vorausgegangener Oxydation zu Säure assimiliert zu werden. (Vergl. Leberle [1]).

Die Versuche waren derart gedacht, daß einige der früher verwendeten Organismen in eine rein mineralische Nährlösung mit bestimmten Esterzusätzen geimpft wurden. Nach einer kurzen Zeit des Wachstums sollten diese Lösungen im Katz'schen Extraktionsapparat mit Aether ausgezogen werden, um in dem Extrakt durch Titration die Gesamtmenge der entstandenen, ätherlöslichen, organischen Säuren festzustellen. Eine zweite Extraktion sollte nach längerer Beobachtungszeit vorgenommen werden, um festzustellen, ob eine Ab- oder Zunahme der bei der ersten Extraktion gefundenen Säuremenge stattgefunden hatte.

[1]) Leberle, H., Dissertation München 1909. Vergl. auch Will & Leberle, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1910. 28. S. 1.

Der erste Versuch wurde mit folgenden acht Organismen angesetzt:

Stamm 93
Oberhefe 25
Steinberg 1892
Wilde Hefe 811
Torula 3
Mykoderma decolorans
Willia anomala Hansen
Sachsia suaveolens

Die zu der wie früher zusammengesetzten mineralischen Nährlösung zugefügten Estermengen betrugen 0,5 und 1 %.

Die erste Aetherextraktion erfolgte nach 7, die zweite nach 35 Tagen, ihre Dauer betrug immer 8 Stunden.

Die in den folgenden Tabellen gegebenen Zahlen sind zuverlässige Mittelwerte aus verschiedenen Kolben und beziehen sich auf je 50 ccm Flüssigkeit.

Zur Titration wurde $\frac{n}{10}$ alkoholische Kalilauge verwendet.

Der erste Versuch ergab folgendes Bild:

Tabelle 1:

Organismen	% Ester	I. Extraktion nach 7 Tagen Verbrauch alkohol. $\frac{n}{10}$ KOH in ccm	II. Extraktion nach 35 Tagen Verbrauch alkohol. $\frac{n}{10}$ KOH in ccm
Stamm 93	0,5	0,02	0,03
	1	0,05	0,08
Oberhefe 25	0,5	0,04	0,02
	1	0,06	0,03
Steinberg 1892	0,5	0,02	0,05
	1	0,06	0,06
Wilde Hefe 811	0,5	0,06	0,01
	1	0,04	0,05
Torula 3	0,5	0,02	0,04
	1	0,02	0,04
Mykoderma decolorans	0,5	0,04	0,05
	1	0,14	0,06
Willia anomala Hansen	0,5	0,02	0,03
	1	0,05	0,04
Sachsia suaveolens	0,5	0,02	0,07
	1	0,04	0,03

Beim zweiten Versuch, bei dem die erste Extraktion der größeren Estermengen und des dadurch bedingten, langsameren Wachstums wegen hinausgeschoben wurde, ergab sich folgendes Bild:

Tabelle 2:

Organismen	% Ester	I. Extraktion nach 14 Tagen	II. Extraktion nach 35 Tagen
		Verbrauch alkohol. $\frac{n}{10}$ KOH in ccm	
Oberhefe 25	2	0,06	0,09
	3	0,09	0,10
Steinberg 1892	2	0,11	0,06
	3	0,12	0,07
Wilde Hefe 811	2	0,07	0,08
	3	0,09	0 09
Mykoderma decolorans	2	0,06	0,04
	3	0,13	0,08

Vergleicht man die Zahlenwerte der Extraktionen, welche die vier bei den Versuchen verwendeten Organismen ergeben haben, unter einander, so ergibt sich folgende Uebersicht:

Tabelle 3:

Organismen	%	I. Extraktion	II. Extraktion	Summe
Oberhefe 25	0,5	0,04	0,02	0,06
	1	0,06	0,03	0,09
	2	0,06	0,09	0,15
	3	0,09	0,10	0,19
Steinberg 1892	0,5	0,02	0,05	0,07
	1	0,06	0,06	0,12
	2	0,11	0 06	0,17
	3	0,12	0,07	0,19
Wilde Hefe 811	0,5	0,06	0,01	0,07
	1	0,04	0,05	0,09
	2	0,07	0,08	0,15
	3	0,09	0,09	0,18
Mykoderma decolorans	0,5	0,04	0,05	0,09
	1	0,14	0,06	0,20
	2	0,06	0,04	0,10
	3	0,13	0,08	0,21

Aus den Versuchen geht hervor, daß die entstandene Gesamtsäuremenge in allen Fällen sehr gering ist.

Im allgemeinen nimmt bei beiden Extraktionen mit wachsender Estermenge auch die Gesamtsäure zu.

Bei der zweiten Extraktion ist die gefundene Säuremenge nicht immer größer, sondern öfters kleiner, als bei der ersten. Dies hängt wahrscheinlich mit dem verschiedenen Verlauf des Wachstums bei den einzelnen Organismen zusammen. Der Höhepunkt des Wachstums wird im allgemeinen voraussichtlich mit dem Höhepunkt der Esterspaltung zusammenfallen. Diesbezüglich sei auf die bei den Zählungen beobachteten ähnlichen Erscheinungen hingewiesen.

Zwischen der Menge des der Nährlösung zugegebenen Esters und der Menge der durch Titration gefundenen Gesamtsäure bestehen unzweifelhaft Beziehungen. Nimmt man jeweils die Summe von zwei zusammengehörigen Werten der zwei zeitlich verschiedenen Extraktionen und vergleicht sie (Tabelle 3), so nimmt die entstandene Gesamtsäure — mit Ausnahme von einem Fall — mit der Menge des zugefügten Esters zu.

Die Art, wie die Versuche verliefen, spricht dafür, daß nicht die gesamte Menge des zugefügten Esters auf einmal gespalten und die entstehende Säure assimiliert wird, sondern daß die Spaltung nach Bedarf der Anzahl der vorhandenen Zellen erfolgt.

Die ursprüngliche Absicht, die entstandenen Säuren einzeln qualitativ zu bestimmen, wurde wegen der außerordentlich geringen Menge entstehender Gesamtsäure aufgegeben.

2. Amylester.

Ein kurzer Versuch mit Amylester ergab folgendes Bild:

Tabelle 4:

Organismen	% Ester	I. Extraktion nach 14 Tagen	II. Extraktion nach 35 Tagen
		Verbrauch alkohol. $\frac{n}{10}$ KOH in ccm	
Stamm 93	0,5	0,03	0,05
	1	0,04	0,08
Steinberg 1892	0,5	0,03	0,06
	1	0,04	0,08
Willia anomala Hansen	0,5	0,04	0,07
	1	0,06	0,53
Mykoderma decolorans	0,5	0,09	0,21
	1	0,11	1,22

Nach den Ergebnissen der Tabelle scheint der Amylester für das Studium der durch Organismen hervorgerufenen Esterspaltung günstigere Bedingungen zu bieten, als der Aethylester, da die in Tabelle 4 erhaltenen Zahlen bedeutend weniger schwanken, als beim Aethylester. Auch sind die Mengen entstandener Gesamtsäure hier bedeutender als dort. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß dies damit zusammenhängt, daß der Amylester infolge seines höheren Siedepunkts während der Beobachtungszeit weniger Verluste durch Verdunstung erleidet, als der Aethylester.

Im übrigen stimmen die hier beobachteten Erscheinungen mit den beim Aethylester gemachten Wahrnehmungen überein. Insbesondere ist eine direkte Abhängigkeit der entstandenen Gesamtsäure von der Menge des zugesetzten Esters und der verschieden langen Zeitdauer seiner Einwirkung nicht zu verkennen.

Die Frage, wie die Spaltung des Esters vor sich geht, besonders, ob sich dieselbe innerhalb oder außerhalb der Zelle abspielt, soll hier nicht eingehender behandelt werden. Nur soviel sei erwähnt, daß zwei Möglichkeiten denkbar sind. Entweder verläuft die Spaltung enzymatisch so, daß der Ester in seine Komponenten Alkohol und Säure gespalten wird. Zunächst wird nun die Säure assimiliert, der Alkohol kann vorläufig unverändert bleiben und bis zu einem gewissen Grade angehäuft werden, bis er schließlich der Oxydation zu Säure und darauffolgender Assimilation verfällt. Oder aber, die Assimilation verläuft in der Weise, daß der Alkohol, wie er entsteht, zu Säure oxydiert und zugleich mit dem Säurekomponenten aufgenommen wird. Nach den Untersuchungen von Leberle[1]) geht bei Mykoderma die Aufnahme von Alkohol über die Säure. Für diese Annahme spricht auch die auffällig geringe Menge entstandener Gesamtsäure bei den vorliegenden Versuchen, sowie die Tatsache, daß es in mehreren Stichproben gelang, am Ende der Versuche Alkohol im Extrakt nachzuweisen.

Bemerkt sei noch, daß beim Amylesterversuch die Kolben, die Mykoderma decolorans & Willia anomala Hansen eingeimpft enthielten, nach längerem Stehen einen unverkennbaren Geruch nach Buttersäure aufwiesen.

[1]) Leberle, H., Dissertation München 1909. Vergl. auch Will & Leberle, Zentralbl. Bakt. II. Abt. 1910. 28. S. 1.

VIII. Kurze Zusammenfassung der Hauptergebnisse der Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit führte im wesentlichen zu folgenden Schlußfolgerungen:

I. Würze mit Esterzusatz.

1. Die beiden Ester wirken bei Gegenwart geringer Mengen in der Regel fördernd, bei Gegenwart größerer Mengen stark verzögernd und hemmend auf die Vermehrung der Organismen.

2. Die Verzögerung steht in direktem Verhältnis zur zugesetzten Estermenge.

3. Einer anfangs hervorgerufenen Verzögerung folgt in vielen Fällen eine Beschleunigung der Vermehrung.

4. Beide Ester können bei spontanen Gärungen nicht als Kampfmittel der sich gleichzeitig entwickelnden Organismen angesprochen werden. Denn die für alle geprüften Organismen festgestellten Grenzkonzentrationen sind bedeutender, als die, soweit bekannt, bei natürlichen Gärungen auftretenden Estermengen.

5. Der Amylester hat sich giftiger erwiesen, als der Aethylester.

6. Gegen Aethylester waren die hautbildenden Sproßpilze und die wilden Hefen widerstandsfähiger, als die Kulturhefen. Gegen Amylester waren die Kulturhefen widerstandsfähiger, als die wilden Hefen und die hautbildenden Sproßpilze.

II. Mineralische Nährlösung mit Esterzusatz.

1. Die beiden Ester können für die verschiedensten Organismen mit Ausnahme der Apiculatusformen als Kohlenstoffquelle dienen. Fast alle verwendeten Organismen kamen aber auch in rein mineralischer Nährlösung ohne jeden Kohlenstoffzusatz fort, wahrscheinlich infolge von Nahrungsaufnahme aus der Luft. Das Wachstum war jedoch in den mit Ester versetzten Kulturen im allgemeinen ein besseres, als beim blinden Versuch.

2. Die beiden Ester wirkten — im Gegensatz zu Würze als Nährlösung — schon in geringen Mengen stark verzögernd. Eine auf die Verzögerung folgende Beschleunigung der Vermehrung wurde nicht beobachtet.

3. Die Verzögerung war wieder direkt proportional der zugefügten Estermenge.

4. Bezüglich der Auffassung der beiden Ester als Kampfmittel bei spontanen Gärungen gilt dasselbe wie bei I.

5. Gegen die beiden Ester waren in diesem Fall die hautbildenden Sproßpilze und die wilden Hefen widerstandsfähiger als die Kulturhefen.